

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Caracterização da fração glicídica do adesivo produzido pelos
pés ambulacrários do ouriço do mar *Paracentrotus lividus*.**

Mariana Dias Simão

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:
Doutora Romana Santos

"If you can dream it, you can do it"

Walt Disney

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Doutora Romana Santos, pela oportunidade de realização deste projeto, pela paciência, pela disponibilidade, pelos conselhos, pela confiança e pela simpatia com que sempre me recebeu. Muito obrigada por tudo e por me deixar entrar no mundo da investigação.

Quero também agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, nomeadamente à Professora Doutora Solveig Thorsteinsdottir (Grupo de Investigação de desenvolvimento e morfogénese evolutiva), à Marta Palma, ao Professor Doutor Leonel Gordo e à Doutora Vera Sequeira (Laboratório de Biologia Pesqueira), ao Professor Doutor Carlos Cordeiro (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular FCT-ICR-MS- Lisboa), à Doutora Vanessa Fonseca (Laboratório de Ecologia Marinha) e à Joana Batista. Um agradecimento especial ao Luís Marques por toda a paciência e disponibilidade demonstrada.

Às minhas amigas de laboratório Mariana, Raquel, Vanessa e Irina quero agradecer pelos momentos de descontração no laboratório (incluindo os momentos musicais proporcionados pela Radar ou pela playlist da Disney da Vanessa), por toda a ajuda, pela paciência e amizade. Agradecer especialmente à Mariana por todo o companheirismo ao longo deste ano, pela ajuda, pelas noitadas no laboratório e por me aturar nos dias em que era mais chata.

Agradecer aos meus amigos por estarem sempre presentes nos altos e baixos, pelos momentos de descontração e motivação, e por todas as palavras de apoio que me deram ao longo deste ano, sobretudo nos momentos de maior nervosismo.

Por fim mas não menos importante, quero agradecer à minha família especialmente aos meus pais, avós e irmã, por todo o amor, educação, motivação, paciência e compreensão. Obrigada por me tornarem uma pessoa melhor e realizada. Este projeto é dedicado a vocês.

Resumo

Os ouriços do mar possuem centenas de órgãos adesivos especializados, os pés ambulacrários, que desempenham um papel fundamental na locomoção, fixação ao substrato e na captura de alimento. Os pés ambulacrários possuem uma forma cilíndrica, sendo compostos por duas unidades funcionais. O caule é cilíndrico, está ligado à carapaça e permite a realização de vários movimentos, pois é móvel e flexível. O disco é achatado, encontra-se na zona mais distal do caule e é essencial no contacto e na adesão ao substrato. Este possui uma epiderme duo-glandular que produz secreções adesivas e “desadesivas”, através das quais os pés ambulacrários se colam e descolam repetidamente do substrato. Apesar de forte, o adesivo dos ouriços do mar é reversível e possui uma resistência superior quando comparado a adesivos sintéticos especialmente em ambientes aquosos, podendo vir a ter aplicações em biomedicina (ex. adesivo cirúrgico) ou em engenharia de tecidos (ex. promotor de adesão celular).

Devido ao crescente interesse pelos adesivos biomiméticos têm-se realizado vários estudos para caracterizar o adesivo dos ouriços do mar, sabendo-se até à data que não só possui uma componente proteica, mas também uma componente glicídica. A fração proteica tem sido alvo de diversos estudos que permitiram identificar algumas proteínas responsáveis pela adesão, polimerização do adesivo e “desadesão” dos ouriços do mar. Ao contrário da fração proteica, pouco se sabe sobre a fração glicídica e até à data apenas foram quantificados os açúcares neutros (1.2%).

Este projeto pretendeu dar uma contribuição nesse sentido, focando-se no estudo da fração glicídica do adesivo secretado pelos pés ambulacrários do ouriço do mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), com recurso a uma bateria de 22 lectinas que foram aplicadas em 3 metodologias complementares (*Enzyme-linked lectin assay*, *lectin blotting* e histoquímica com lectinas). Das lectinas testadas apenas 5 marcaram exclusivamente a epiderme adesiva e em simultâneo o adesivo secretado, sendo por isso as mais relevantes para a compreensão da adesão reversível dos ouriços do mar. Através das diferentes metodologias foi possível determinar que a componente glicídica do adesivo contém N-acetilglucosamina livre, e pelo menos três glicoproteínas com massas moleculares de 72, 135 e > 180 kDa com resíduos de N-acetilglucosamina, ácido siálico e N-acetilgalactosamina.

A presença de glícidos na secreção adesiva de vários animais marinhos e terrestres, revela a importância destes para a sua adesão. Pensa-se que os glícidos conferem aos adesivos elevada resistência, coesão adesiva, e proteção contra a degradação por exo- e endo-proteases, sendo particularmente importantes para a compreensão do funcionamento dos adesivos reversíveis, como os adesivos do ouriço do mar, uma vez que são maioritariamente compostos por proteínas e glícidos, ao contrário dos adesivos permanentes que são compostos quase exclusivamente por proteínas.

Palavras chave: ouriço do mar, *Paracentrotus lividus*, glícidos, lectinas, adesivo biomimético

Abstract

Sea urchins have hundreds of specialized adhesive organs, the tube feet, which play a key role in locomotion, substrate attachment and food capture. Tube feet have a cylindrical shape and are composed by two functional units. The stem is cylindrical, attaches to the test and allows various movements as it is mobile and flexible. The disc is flat, located in the most distal area of the stem and is essential for contact and substrate adhesion. It is composed of a duo-glandular epidermis that produces adhesive and de-adhesive secretions, which allow them to repeatedly attach and detach from the substrate. Although strong, this adhesive is reversible and it has superior strength when compared to synthetic adhesives especially in aqueous environments, and therefore it may have biomedical (eg surgical adhesive) or tissue engineering (eg. cell adhesion) applications.

Due to the growing interest in biomimetic adhesives, several studies have been carried out to characterize the sea urchin adhesives, and up to date that it has been shown that it is composed not only by a protein fraction but also a glycosidic one. The protein fraction has been the subject of several studies, that allowed to identify some proteins responsible for adhesion, polymerization of adhesive and detachment from sea urchins. Unlike the protein fraction, little is known about the glycosidic fraction and so far only neutral sugars (1.2%) have been quantified.

This project aims at contributing to this topic by focusing on the characterization of the glycosidic fraction of the adhesive secreted by the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), using a battery of 22 lectins that were applied to 3 complementary techniques (Enzyme-linked lectin assay, lectin blotting and lectin histochemistry). Only 5 of the tested lectins labelled exclusively the adhesive epidermis and the secreted adhesive simultaneously, being therefore the most relevant ones to understand the reversible adhesion of sea urchins. Using the different techniques, it was possible to determine that the glycosidic component of the adhesive contains free N-acetylglucosamine, and at least three glycoproteins with molecular weights of 72, 135 and >180 kDa with residues of N-acetylglucosamine, sialic acid and N-acetylgalactosamine.

The presence of glycid in the adhesive secretion of various marine and terrestrial animals reveals their importance for animal adhesion. Glycid are believed to provide adhesives with high strength, adhesive cohesion, and protection against degradation by exo- and endo-proteases. They are particularly important to understand how reversible adhesives, like the ones from sea urchins work, since they are mostly composed of proteins and glycid, unlike permanent adhesives that are composed mainly by proteins.

Key words: sea urchin, *Paracentrotus lividus*, glycid, lectins, biomimetic adhesive

Índice

Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
1. Introdução.....	1
1.1.Os pés ambulacrários dos ouriços do mar	2
1.2. A secreção adesiva dos ouriços do mar	4
1.3. Comparação do adesivo dos ouriços do mar com outros bioadesivos marinhos.....	7
1.4. Vantagens dos bioadesivos marinhos e possíveis aplicações	9
1.5. Objetivos	10
2. Material e métodos	12
2.1. Recolha de ouriço do mar e sua manutenção em aquário.....	12
2.2. Recolha de amostras.....	13
2.2.1. Recolha de pés ambulacrários	13
2.2.2. Recolha de adesivo	13
2.3. Extração de proteínas	13
2.3.1. Extração de proteínas dos pés ambulacrários.....	13
2.3.2. Extração de proteínas do adesivo secretado	14
Tampão 1 - Tris-HCl 63.2 mM, 2% SDS, 0.5 M DTT, pH 6.8.....	14
Tampão 2 - Tris-HCl 1.5 M, 7 M GndHCl, 20 mM EDTA, 0.5 M DTT 0.5, pH 8.5	14
Tampão 3 - 8M Ureia, 2% SDS, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, pH 4.3	14
2.4. Quantificação de proteínas	15
2.5. Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)	15
2.6. Separação de proteínas (SDS-PAGE) e <i>Lectin blotting</i>	17
2.7. Histoquímica com lectinas	18
2.7.1. Imunohistoquímica com lectinas.....	18
2.8. Colorações.....	19
2.8.1. Coloração Tricrômio de Masson	20
2.8.2. Coloração azul <i>Alcian</i>	20
3. Resultados	21
4. Discussão dos resultados	44
5. Conclusão e perspectivas futuras	49
6. Referências	50
7. Anexos.....	54

Lista de Figuras

Figura 1.1 Características particulares do filo <i>Echinodermata</i>	1
Figura 1.2 Características estruturais do filo <i>Echinodermata</i>	2
Figura 1.3 Morfologia externa e interna do pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i>	3
Figura 1.4 Estruturas de suporte do disco do pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i>	3
Figura 1.5 Ultraestrutura da epiderme do disco do pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i> e respectivos grânulos de secreção, observada por microscopia eletrônica de transmissão.....	4
Figura 1.6 Morfologia do adesivo secretado pelo pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i>	4
Figura 1.7 Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da superfície de polimetilmetacrilato liso e rugoso e dos discos de pés ambulacrários de <i>P. lividus</i> depois de descolados destes substratos.....	6
Figura 1.8 Modelo molecular da adesão reversível do ouriço do mar e principais intervenientes.....	7
Figura 1.9 Imunolocalização da proteína adesiva Nectina nos pés ambulacrários do ouriço do mar <i>P. lividus</i> e no adesivo secretado.....	7
Figura 1.10 Organismos marinhos que representam os diferentes tipos de adesão.....	8
Figura 1.11 Análise comparativa da composição bioquímica e das proporções dos 6 aminoácidos mais abundantes nos adesivos da estrela do mar <i>A. rubens</i> , do ouriço do mar <i>P. lividus</i> e do pepino do mar <i>H. forskali</i>	9
Figura 2.1 Habitat natural dos ouriço do mar <i>P. lividus</i> na Praia do Matadouro e habitat artificial em aquário de água salgada recriado no laboratório.....	12
Figura 2.2 Pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i> mostrando o local onde foi seccionado para separar o disco (zona adesiva) do caule (zona não adesiva). Círculo de adesivo fixo a lâmina de microscópio, e corados com uma solução aquosa de 0.05% de corante violeta cristal e observado por microscopia ótica. Múltiplos círculos adesivos fixos a uma caixa de Petri de vidro e corados com uma solução aquosa de 0.05% de corante violeta cristal.....	13
Figura 2.3 Quantificação de proteínas através do ensaio colorimétrico de Bradford.....	15
Figura 2.4 Esquema e resultado final de um ensaio ELLA utilizado para determinar os glícidos presentes em amostras de discos (zona adesiva) e caules (zona não adesiva). Esquema da sequência de reações que ocorrem no ensaio ELLA.....	16
Figura 2.5 Esquema do procedimento de SDS-PAGE.....	17
Figura 2.6 Esquema do procedimento do <i>Lectin blotting</i>	18
Figura 2.7 Esquema do procedimento da histoquímica de lectinas.....	19
Figura 3.1 Imagens do adesivo do ouriço do mar <i>P. lividus</i> recolhido em lâminas de microscópio, coradas com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal, antes e depois da solubilização com os 3 tampões testados.....	22
Figura 3.2 Secção longitudinal de um pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i> corada com Tricrômico de Masson e observada por microscopia ótica com uma ampliação de 20× e 40×.....	22
Figura 3.3 Secção longitudinal de um pé ambulacrário do ouriço do mar <i>P. lividus</i> corada com azul de Alcian e observada por microscopia ótica com uma ampliação de 20× e 40×.....	23
Figura 3.4 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com lectina GSL II (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II) que deteta preferencialmente N-acetilglucosamina.....	23
Figura 3.5 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina GSL II (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II)	25

Figura 3.6 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas ConA (Concavaline A), LCA (<i>Lens culinaris</i> agglutinin) e PSA (<i>Pisum sativum</i> agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilglucosamina ligada a Manose ou Glucose.....	25
Figura 3.7 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina ConA (<i>Concavaline A</i>)	26
Figura 3.8 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina LCA (<i>Lens culinaris</i> agglutinin)	27
Figura 3.9 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina PSA (<i>Pisum sativum</i> agglutinin)	28
Figura 3.10 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas PHA-E (<i>Phaseolus vulgaris erythro</i> agglutinin) e PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris leuco</i> agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilglucosamina ligada a Galactose e Manose, ou só N-acetilglucosamina ou Manose	28
Figura 3.11 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina PHA-E (<i>Phaseolus vulgaris erythro</i> agglutinin)	29
Figura 3.12 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina PHA-L (<i>Phaseolus vulgaris leuco</i> agglutinin)	30
Figura 3.13 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas DBA (<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin) e VVA (<i>Vicia villosa</i> agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilgalactosamina.....	30
Figura 3.14 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina DBA (<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin)	31
Figura 3.15 Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina VVA (<i>Vicia villosa</i> agglutinin)	31
Figura 3.16 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com lectina ECL (<i>Erythrina cristagalli</i> lectin) que deteta preferencialmente N-acetilgalactosamina, lactose, N-acetilgalactosamina e Galactose.....	32
Figura 3.17 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina ECL (<i>Erythrina cristagalli</i> lectin)	32
Figura 3.18 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas SNA/EBL (<i>Sambucus nigra</i> - Elderberry agglutinin) e MAL II (<i>Maackia amurensis</i> lectin II) que detetam preferencialmente ácido siálico ligado a Galactose e N-acetilgalactosamina.....	33
Figura 3.19 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina SNA/EBL (<i>Sambucus nigra</i> - Elderberry agglutinin)	34
Figura 3.20 Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina MALII (<i>Maackia amurensis</i> lectin II)	34
Figura 3.21 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas WGA (Wheat germ agglutinin), sWGA (Succinylated wheat germ agglutinin), STL (<i>Solanum tuberosum</i> lectin), DSL (<i>Datura stramonium</i> lectin) e LEL (<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin) que detetam preferencialmente quitobiose, N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina.....	35
Figura 3.22 Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina sWGA (Succinylated wheat germ agglutinin)	35

Figura 3.23 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina WGA (Wheat germ agglutinin)	36
Figura 3.24 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina STL (<i>Solanum tuberosum</i> lectin)	37
Figura 3.25 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina DSL (<i>Datura stramonium</i> lectin)	38
Figura 3.26 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina LEL (<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin)	39
Figura 3.27 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas Jacalin, PNA (Peanut agglutinin), SBA (Soybean agglutinin), GSL I (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I) e RCA I (<i>Ricinus communis</i> agglutinin I) que detetam Galactose e N-acetilgalactosamina.....	40
Figura 3.28 Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina PNA (Peanut agglutinin)	40
Figura 3.29 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina SBA (Soybean agglutinin)	41
Figura 3.30 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina GSL I (<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I)	42
Figura 3.31 Compilação dos resultados obtidos por <i>lectin blotting</i> e histoquímica usando a lectina RCA I (<i>Ricinus communis</i> agglutinin I)	42
Figura 3.32 Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar <i>P. lividus</i> , incubados com as lectinas UEA I (<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I) que deteta Fucose.....	43
Figura 3.33 Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina UEA I (<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I)	43
Figura 4.1 Compilação dos resultados obtidos para a lectinas GSL II, WGA, STL, LEL e SBA.....	46
Figura 4.2 Novo modelo molecular dos principias intervenientes na adesão reversível do ouriço do mar <i>P. lividus</i> à luz dos resultados obtidos no presente projeto.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Tenacidade média dos pés ambulacrários dos ouriços do mar em várias espécies.....	5
Tabela 1.2 Tenacidade média de vários adesivos sintéticos e biológicos.....	8
Tabela 3.1 Valores relativos à quantificação de proteínas em extratos de discos e caules de pés ambulacrários do ouriço do mar <i>P. lividus</i>	21
Tabela 3.2 Peso e concentração do adesivo do ouriço do mar <i>P. lividus</i> solubilizado com os 3 tampões testados.....	21
Tabela 3.3 Agrupamento das lectinas utilizadas, em função dos glícidos que detetam.....	24
Tabela 4.1 Compilação dos resultados obtidos para as 22 lectinas com as 3 técnicas usadas para detetar glícidos livres e conjugados nos pés ambulacrários e no adesivo secretado do ouriço do mar <i>P. lividus</i>	45
Tabela Suplementar 7.1 Compilação das concentrações de lectinas biotiniladas e diluições de Alexa 488 conjugado com streptavidina, utilizadas no <i>lectin blotting</i> e na histoquímica de lectinas, e concentrações dos glícidos inibitórios utilizados no ELLA.....	54
Tabela Suplementar 7.2 – Compilação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários, e para as amostras sem proteína.....	56

Lista de Abreviaturas

Alexa 488 strep	Fluoróforo Alexa Fluor 488 conjugado com streptavidina
BSA	Albumina do soro bovino (<i>Bovine serum albumine</i>)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
ConA	<i>Concavalina A</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DBA	<i>Dolichos biflorus agglutinin</i>
DSL	<i>Datura stramonium lectin</i>
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Erythrina cristagalli lectina</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ELLA	<i>Enzyme-Linked Lectin Assay</i>
Gal	Galactose
GalNac	N-acetilgalactosamina
Glc	Glucose
GlcNac	N-acetilgalactosamina
GlcNacβ(1,4) GlcNac	Quitobiose
GndHCl	Cloreto de guanidina
GSL I	<i>Griffonia simplicifolia lectin I</i>
GSL II	<i>Griffonia simplicifolia lectin II</i>
HCl	Ácido clorídrico
HRP strep	<i>Horseradish peroxidase streptavidine</i>
LCA	<i>Lens culinaris agglutinin</i>
LEL	<i>Lycopersicon esculentum lectin</i>
MAL II	<i>Maackia amurensis lectin II</i>
Man	Manose
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MnCl₂	Cloreto de manganês
NaCl	Cloreto de sódio
NeuAc	Ácido siálico
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris erythro agglutinin</i>
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris leuco agglutinin</i>
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
PSA	<i>Pisum sativum agglutinin</i>
PTMs	Modificações pós-tradução (<i>Post-translational modifications</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (<i>Polyvinylidene fluoride</i>)
RCA I	<i>Ricinus communis agglutinin I</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
SBA	<i>Soybean agglutinin</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser	Serina
SNA/EBL	<i>Sambucus nigra - Elderberry agglutinin</i>
STL	<i>Solanum tuberosum lectin</i>

sWGA	<i>Succinylated wheat germ agglutinin</i>
TCA	Ácido trifluoroacético
Thr	Treonina
TBS	Tampão Tris salino (<i>Tris Buffered Saline</i>)
UEA I	<i>Ulex europaeus agglutinin I</i>
VVA	<i>Vicia villosa agglutinin</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
ZnCl₂	Cloreto de zinco

1. Introdução

O filo *Echinodermata* encontra-se subdividido em cinco classes *Crinoidea* (crinóides), *Asteroidea* (estrelas do mar), *Ophiuroidea* (ofiúros), *Echinoidea* (ouriços do mar) e *Holothuroidea* (pepinos-do-mar) (Flammang *et al.* 2016).

Características particulares como o esqueleto dérmico (endoesqueleto), um sistema vascular aquífero, um sistema hemal e uma metamorfose com alteração da simetria tornam o filo *Echinodermata* único. O esqueleto dérmico é constituído por ossículos calcários (estes podem apresentar projeções espinhosas que frequentemente atravessam a epiderme), espinhos e pedicelários (estruturas de defesa presentes em algumas classes). O sistema vascular aquífero ou sistema ambulacrário é composto por uma zona central, em que a água entra pela placa madreporica situada na face aboral do organismo e segue pelo canal da pedra até à face oral onde se une ao canal circular, e aos canais radiais, que por sua vez estão ligados aos pés ambulacrários. O sistema hemal é um sistema vascular muito reduzido onde circula o fluído celómico. Em relação à simetria existe uma grande diversidade de formas larvares com simetria bilateral que durante o desenvolvimento adquirem simetria pentaradiada (Figura 1.1) (Brooker *et al.* 2017).

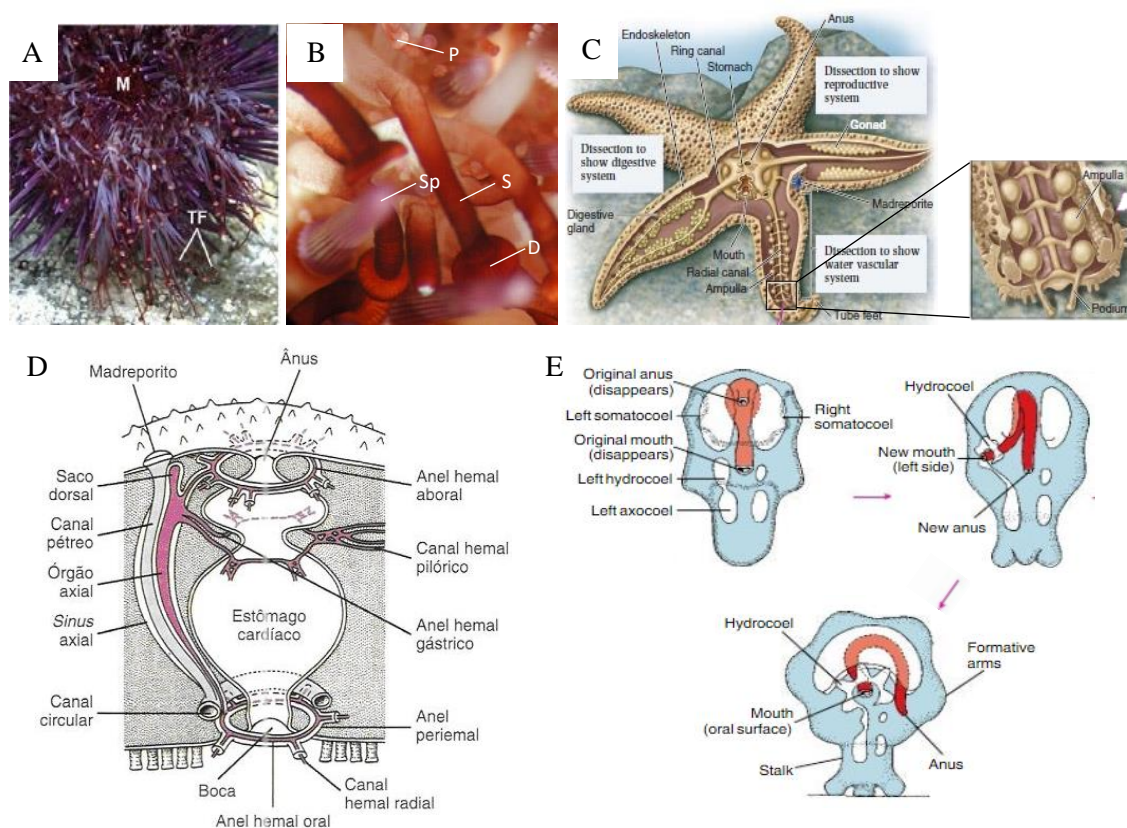


Figura 1.1 - Características particulares do filo *Echinodermata*. **A** – Face oral do ouriço do mar *P. lividus* e imagem ampliada do seu esqueleto dérmico mostrando os espinhos e pés ambulacrários (**B**); **C** – Esquema representativo da anatomia interna de uma estrela do mar, com ênfase no sistema ambulacrário, característico dos equinodermes; **D** – Esquema representativo do sistema hemal de uma estrela do mar.; **E** – Esquema representativo da metamorfose de uma estrela do mar mostrando a simetria bilateral das larvas. Legenda: D – disco; M – boca; P – pedicelário; S – caule; Sp – Espinho; TF – pés ambulacrários. (Adaptado de Hickman *et al.* 2003, Santos *et al.* 2013, Brooker *et al.* 2017).

O filo *Echinodermata* possui ainda outras características estruturais. Delas fazem parte um sistema digestivo simples composto por um canal alimentar que pode por vezes possuir estruturas “tritadoras” como a lanterna de Aristóteles nos ouriços do mar. Por outro lado, contém um sistema respiratório difuso possuindo uma respiração tegumentar, particularmente ao nível dos pés ambulacrários. O sistema reprodutor é simples, composto por gónadas simples ou múltiplas, sendo a

fertilização externa. O sistema nervoso é definido como simples, composto por um anel nervoso central conectado a uma série de cordões nervosos radiais, que por sua vez se ligam a ramificações periféricas (Figura 1.2A). Este filo pode apresentar dois tipos de sistemas adesivos, os pés ambulacrários (Figura 1.2B) (presentes em todos os equinodermes) e os túbulos ou órgãos de Cuvier (Figura 1.2C) (presentes em alguns pepinos do mar). Estes sistemas adesivos diferenciam-se pela sua estrutura, composição do adesivo, forma de atuar e função (Flammang *et al.* 2016, Brooker *et al.* 2017).

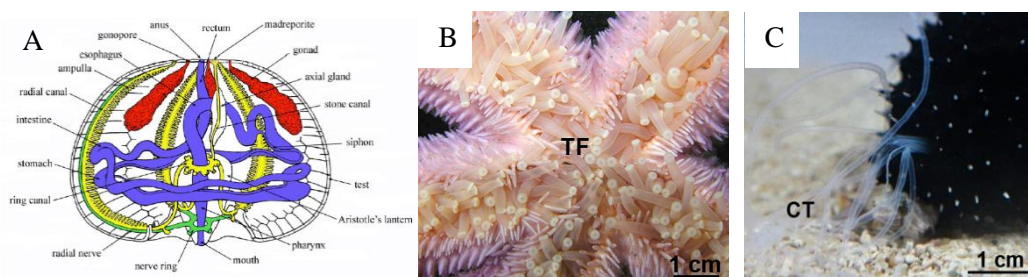


Figura 1.2 – Características estruturais do filo *Echinodermata*. **A** - Morfologia interna do ouriço do mar, **B** – Face oral da estrela do mar *Asterias rubens*, **C** – Pepino do mar *Holothuria forskali* expulsando túbulos de Cuvier. Legenda: Vermelho – Sistema reprodutor; Amarelo – Sistema ambulacrário; Azul – Sistema digestivo; Verde – Sistema nervoso; TF – pés ambulacrários; CT – túbulos de Cuvier. (A - imagem cedidas por Romana Santos, B e C - adaptado de Hennebert *et al.* 2018).

1.1. Os pés ambulacrários dos ouriços do mar

O ouriço do mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) encontra-se distribuído pelo nordeste do Oceano Atlântico e por todo o mar Mediterrâneo, sendo a espécie predominante na costa rochosa portuguesa continental (Gago *et al.* 2003). Esta espécie habita zonas intertidais, ou seja, zonas de substratos duros e com elevado hidrodinamismo (Santos & Flammang 2005). Pertence ao Filo *Echinodermata* e à Classe *Echinoidea* e tem sido a espécie mais estudada para compreender o mecanismo de adesão dos ouriços do mar.

Tal como nos restantes equinodermes, o sistema ambulacrário dos ouriços do mar é composto por centenas de pés ambulacrários, que permitem a este animal resistir ao hidrodinamismo, fixando-o ao substrato, mas que também desempenham um papel importante na locomoção e na captura de alimento (Flammang *et al.* 2016).

Os pés ambulacrários possuem uma forma cilíndrica, sendo compostos pelo caule e pelo disco. O caule está ligado à carapaça do ouriço do mar e permite a realização de vários movimentos, pois é móvel e flexível. O disco encontra-se na zona mais distal do caule e possui uma forma achatada, essencial no contacto e na adesão ao substrato (Flammang 1996). Em termos histológicos os pés ambulacrários são compostos por: um miomesotélio interno, tecido conjuntivo, um plexo nervoso e uma epiderme externa revestida por uma cutícula (Figura 1.3) (Santos & Flammang 2006).

O miomesotélio rodeia o lúmen, ou seja, a cavidade interna do pé ambulacrário que se enche ou esvazia de água para esticar ou contrair o pé, respetivamente. Faz parte da constituição do miomesotélio, os peritoneócitos que revestem o lúmen ambulacrário e os miócitos que integram a musculatura do pé ambulacrário (Santos & Flammang 2006).

O tecido conjuntivo é composto por fibras de colagénio, fibrócitos, por vários outros tipos de células mesenquimatosas e por elementos esqueléticos. No disco o tecido conjuntivo forma uma placa circular terminal composta por fibras de colagénio bastante compactas. Da superfície distal desta placa emergem vários septos de tecido conjuntivo, que se ligam apicalmente às células da epiderme (Santos *et al.* 2005, 2009a). O disco possui também um esqueleto calcificado composto por duas estruturas distintas: roseta distal e uma moldura proximal. Ambas as estruturas apresentam uma forma de anel, encontrando-se dispostas circularmente em torno do lúmen na zona do caule. A roseta é composta por quatro ou cinco ossículos com projeções semelhantes, estando estas direcionadas para a superfície apical do disco (Figura 1.4) (Santos & Flammang 2006).

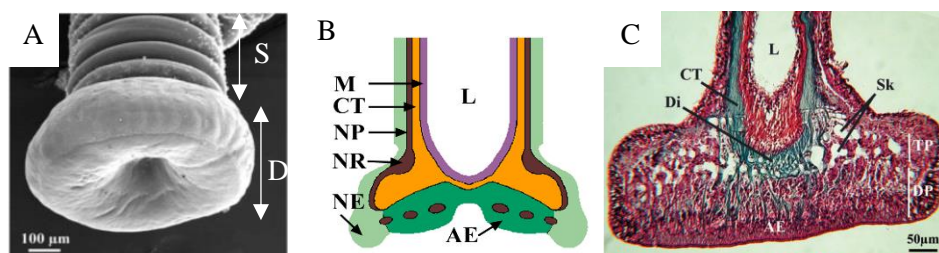


Figura 1.3 - Morfologia externa e interna do pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus*. **A** – Morfologia externa observada por microscopia eletrônica de varrimento, **B** – Representação esquemática da estrutura histológica, **C** – Secção longitudinal corada com Tricrômico de Masson e observada por microscopia ótica. Legenda: AE – epiderme adesiva; D - disco; Di – diafragma; DP – placa distal; L – lúmen; M – miomesotélio; CT – tecido conjuntivo; NP – plexo nervoso; NR – anel nervoso; NE – epiderme não adesiva; S – caule; Sk – esqueleto calcário; TP – placa terminal (Adaptado de Santos *et al.* 2005, Santos & Flammang 2006).

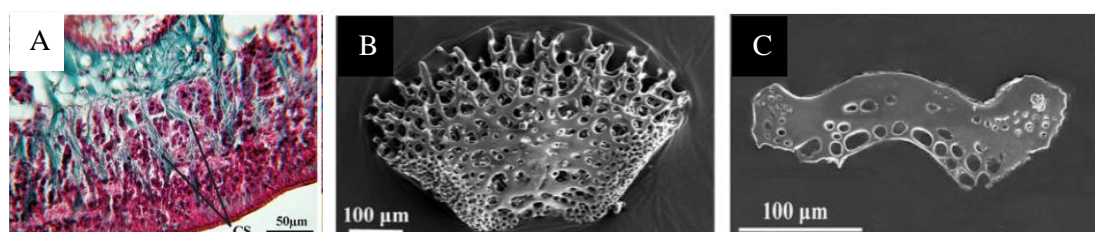


Figura 1.4 – Estruturas de suporte do disco do pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus*. **A** – Placa terminal de tecido conjuntivo em corte longitudinal do disco do pé ambulacrário corado com Tricrômico de Masson e observado por microscopia ótica, **B** – Ossículo da roseta e **C** – Moldura proximal observados por microscopia eletrônica de varrimento. Legenda: CS – septos de tecido conjuntivo (Adaptado de Santos *et al.* 2005, Santos & Flammang 2006).

O tecido nervoso forma um anel nervoso na base do disco, sendo este uma extensão do plexo nervoso do caule (Santos & Flammang 2006).

Sobre o plexo nervoso encontra-se a epiderme, revestida pela cutícula (Figura 1.3) (Santos & Flammang 2006). Existem duas zonas distintas na epiderme do disco, uma zona adesiva central e uma zona sensorial periférica. Apenas a parte central está envolvida na fixação do pé ambulacrário ao substrato, sendo constituída por quatro tipos de células: as células de suporte, as células sensoriais, as células adesivas e as células “desadesivas”. As células mais abundantes são as células de suporte que apresentam na zona apical filamentos intermédios e numerosas microvilosidades. As células sensoriais são compostas por um cílio apical curto que atravessa a cutícula. As células adesivas podem ser de um ou dois tipos. No caso do ouriço do mar *P. lividus* foram observados dois tipos, um tipo de células na zona central do disco contendo grânulos com um diâmetro entre 500 – 700 nm e outro tipo de células distribuídas pela restante epiderme do disco, contendo grânulos menores com 300-500 nm de diâmetro. As células “desadesivas” são sempre de um só tipo, contendo pequenos grânulos elípticos (150 – 200 × 200 – 300 nm), e apresentando um pequeno cílio subcuticular característico na zona apical da célula (Figura 1.5) (Ameye *et al.* 2000, Santos & Flammang 2006).

A existência de um sistema adesivo duo-glandular na epiderme do disco, permite a adesão forte ao substrato, mas de forma reversível, uma vez que este contém dois tipos de células secretoras que libertam separadamente uma secreção adesiva e outra “desadesiva” (Thomas & Hermans 1985, Flammang 1996). É através da cutícula do disco que a secreção adesiva é libertada para a superfície. Esta forma uma espécie de filme fino que permite a adesão do disco ao substrato. A secreção “desadesiva” é libertada da mesma forma para a superfície, onde poderá atuar como um enzima, uma vez que o adesivo secretado permanece quase sempre firmemente agarrado ao substrato (Thomas & Hermans 1985, Flammang & Jangoux 1993, Flammang 1996, Flammang *et al.* 1998a, Flammang *et al.* 2005, Santos & Flammang 2006, Flammang *et al.* 2016).

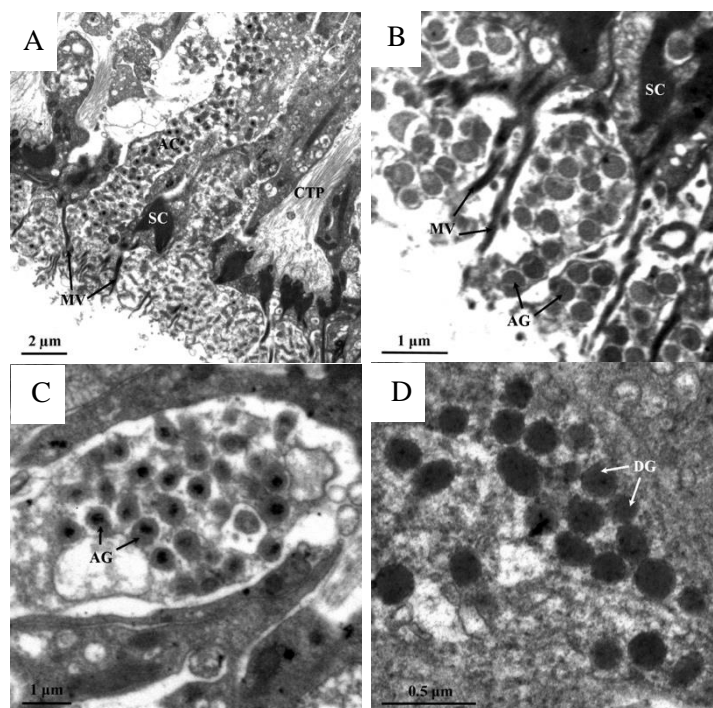


Figura 1.5 – Ultraestrutura da epiderme do disco do pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus* (A) e respectivos grânulos de secreção (B-D), observada por microscopia eletrônica de transmissão. Legenda: AC – células adesivas; AG - grânulos adesivos; CTP - protuberância de tecido conjuntivo; DG – grânulos “desadesivos”; MV - Projeção celular semelhante a uma microvilosidade; SC - células de suporte. (Adaptado de Santos & Flammang 2006).

1.2. A secreção adesiva dos ouriços do mar

O adesivo secretado forma geralmente um círculo correspondente à forma e diâmetro da superfície do disco dos pés ambulacrários. À semelhança de outros adesivos marinhos este adesivo forma uma rede de agregados de nano-estruturas globulares (Figura 1.6) (Viana & Santos 2018). Em termos de espessura esta é variável, mas é extremamente fina com valores médios de 100 nm para o adesivo de *P. lividus* (Santos *et al.* 2009a).

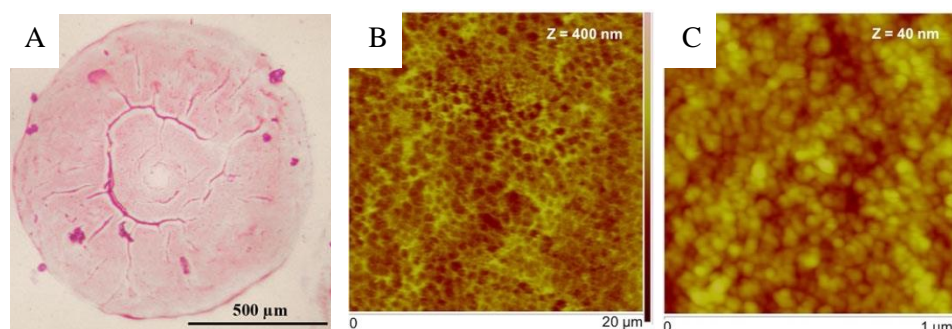


Figura 1.6 – Morfologia do adesivo secretado pelo pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus*. A – Adesivo corado com uma solução aquosa de 0.05% de Violeta cristal e observada por microscopia ótica. B e C – Imagens da topografia do adesivo depositado em mica e observado por microscopia de força atômica em detalhe (Adaptado de Santos & Flammang 2006, Viana & Santos 2018).

A reversibilidade do bioadesivo dos ouriços do mar na presença de água tem sido estudada e comparada com outros adesivos biológicos e sintéticos. A tenacidade (força de adesão por unidade de área expressa em Pascal) dos pés ambulacrários dos ouriços do mar foi avaliada em várias espécies

(Tabela 1.1), demonstrando-se que o seu adesivo é resistente e eficaz aderindo a diversas superfícies em ambientes aquosos (Santos & Flammang 2006).

Tabela 1.1 – Tenacidade média dos pés ambulacrários dos ouriços do mar em várias espécies. (Adaptado de Flammang *et al.* 2016).

Adesivo		Tenacidade (MPa) (força de adesão/unidade de área)	Substrato	Referência
Ouriços do mar	<i>Arbacia lixula</i>	0.09	Vidro	Santos & Flammang 2006
	<i>Colobocentrotus atratus</i>	0.54	Polimetilmetacrilato	Santos & Flammang 2008
	<i>Echinometra mathaei</i>	0.22	Polimetilmetacrilato	Santos & Flammang 2008
	<i>Heterocentrotus trigonarius</i>	0.25	Polimetilmetacrilato	Santos & Flammang 2008
	<i>Paracentrotus lividus</i>	0.29–0.31	Vidro	Santos & Flammang 2006
		0.34	Polimetilmetacrilato	Santos <i>et al.</i> 2005 Santos & Flammang 2006
		0.14–0.17	Polipropileno	Santos <i>et al.</i> 2005 Santos & Flammang 2006
		0.29	Poliestireno	Santos & Flammang 2006
	<i>Sphaerechinus granularis</i>	0.20	Vidro	Santos & Flammang 2006
	<i>Stomopneustes variolaris</i>	0.21	Polimetilmetacrilato	Santos & Flammang 2008

Também se avaliou o comportamento do adesivo em superfícies lisas e rugosas, concluindo-se que o disco possui propriedades visco-elásticas que lhe permitem replicar o perfil do substrato e desta forma secretar apenas uma fina camada de adesivo qualquer que seja a rugosidade da superfície à qual se fixa (Figura 1.7) (Santos *et al.* 2005).

Em termos de composição bioquímica, o adesivo do ouriço do mar *P. lividus* é composto por uma grande fração inorgânica (45%), mas também por proteínas (6.4%), glícidos (1.2% de açúcares neutros) e lípidos (2.5%). Os lípidos embora tenham sido detetados no material adesivo não foram detetados nos grânulos de secreção das células adesivas (Santos *et al.* 2009b). No entanto, noutros organismos modelo com as cracas, estes parecem ter um papel importante na adesão marinha nomeadamente para dispersar as moléculas de água do substrato antes da secreção do adesivo (Gohad *et al.* 2014).

A fração proteica do adesivo de *P. lividus* é a que se encontra mais bem caracterizada uma vez que foi alvo de vários estudos. Em termos de análise de aminoácidos sabe-se que este adesivo possui maior quantidade de aminoácidos apolares do que polares (57.4% e 42.6% respetivamente), e que existe uma predominância de 6 aminoácidos que totalizam mais de metade dos resíduos: alanina (9.8%),

glicina (9.7%), valina (8.9%), serina (8.6%), treonina (7.4%) e glutamato/ácido glutâmico (7.4%) (Santos *et al.* 2009b). Também se sabe que as proteínas que compõe o adesivo possuem maiores quantidades de prolina (6.8%) e cisteína (2.6%) do que é comum nas proteínas de eucariotas (Santos *et al.* 2009b). Pensa-se que os resíduos de cisteína possam estar envolvidos em ligações persulfureto intermoleculares, tendo um papel importante na coesão do adesivo e contribuindo para a sua insolubilidade (Flammang *et al.* 1998a, Flammang 2006). Os aminoácidos alanina, glicina, serina e prolina estão presentes em grandes quantidades em proteínas elastoméricas, o que pode explicar a alta resistência coesiva do adesivo, uma vez que estas proteínas podem resistir à deformação sem haver alterações significativas na sua estrutura (Tatham & Shewry 2000). Os aminoácidos valina, serina e treonina podem ser importantes na fixação do adesivo a diversos tipos de substratos, estabelecendo ligações de hidrogénio e interações electrostáticas. O glutamato poderá estar também envolvido nas interações adesivas com o substrato através de ligações de hidrogénio e ligações iónicas (Santos *et al.* 2009b).

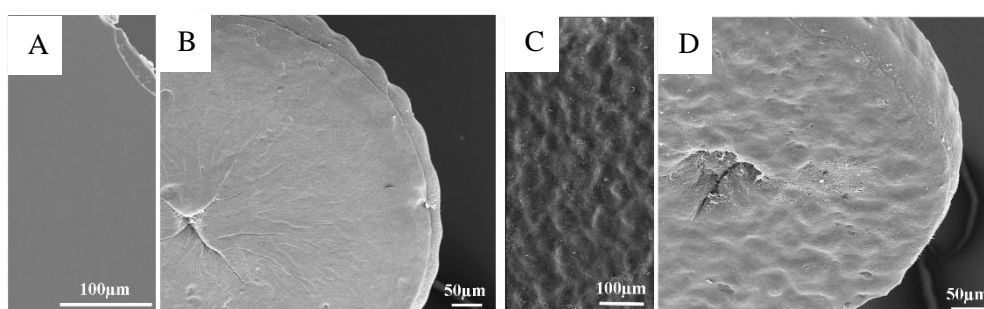


Figura 1.7 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento da superfície de polimetilmetacrilato liso (A) e rugoso (C) e dos discos de pés ambulacrários de *P. lividus* depois de descolados destes substratos (B, D). (Adaptado de Santos *et al.* 2005).

Através de vários estudos de proteômica e identificação de proteínas por espectrometria de massa, foi possível identificar proteínas-chave envolvidas no processo de adesão reversível dos ouriços do mar a vários níveis, desde a biossíntese das proteínas, à sua modificação pós-tradução, ao seu empacotamento em grânulos de secreção e extrusão, até aos constituintes da secreção adesiva e “desadesiva” (Figura 1.8) (Santos *et al.* 2013, Lebesgue *et al.* 2016).

Destaca-se a identificação da proteína Nectina, identificada anteriormente como sendo relevante para a adesão dos ovos/embriões do ouriço do mar *P. lividus* (Matranga *et al.* 1992), mas nunca antes identificada nos órgãos adesivos adultos. A Nectina foi detetada no proteoma, glico-subproteoma e fosfo-subproteoma dos pés ambulacrários e também no proteoma do adesivo (Santos *et al.* 2013, Lebesgue *et al.* 2016). Esta proteína possui 6 domínios de ligação à galactose, tendo assim a capacidade de se ligar a moléculas de galactose e N-acetilglucosamina (Costa *et al.* 2010). A Nectina presente nos discos é altamente homóloga à Nectina presente nos ovos/embriões, mas contém algumas diferenças em termos de sequência, tais como os possíveis locais de glicosilação (Santos *et al.* 2013, Mistry *et al.* 2003). Esta proteína encontra-se 13 vezes mais sobre-expressa nos discos do que nos caules, estando presente na epiderme adesiva dos discos dos pés ambulacrários, bem como no adesivo secretado (Figura 1.9), parecendo indicar que está envolvida na adesão dos ouriços do mar adultos, contribuindo para a sua fixação ao substrato e/ou para a coesão do adesivo (Santos *et al.* 2013, Lebesgue *et al.* 2016).

Pensa-se que a secreção “desadesiva” seja composta por enzimas que quebram as ligações estabelecidas entre o adesivo e a epiderme do disco, explicando assim que o adesivo secretado permaneça quase sempre firmemente colado ao substrato (Flammang *et al.* 1998a). Foram já identificadas várias proteases e glicosilases sobre-expressas no disco relativamente ao caule, indicando a possibilidade de estas serem constituintes da secreção “desadesivas”. Estas incluem hidrolases que atuam nas ligações peptídicas (aminopeptidase, dipeptidase, bleomicina e catepsina Z), mas também

que atuam nos grupos glicídicos (N-beta-n-acetilglucosaminil-l-asparaginase, sialidase) (Santos *et al.* 2013, Lebesgue *et al.* 2016). A abundância destas enzimas no disco adesivo, poderá indicar a presença no adesivo dos ouriços do mar de resíduos glicídicos conjugados com proteínas através asparaginas e de ácido siálico, na forma livre ou conjugada, à semelhança do que foi reportado para o adesivo das estrelas do mar (Hennebert *et al.* 2011).

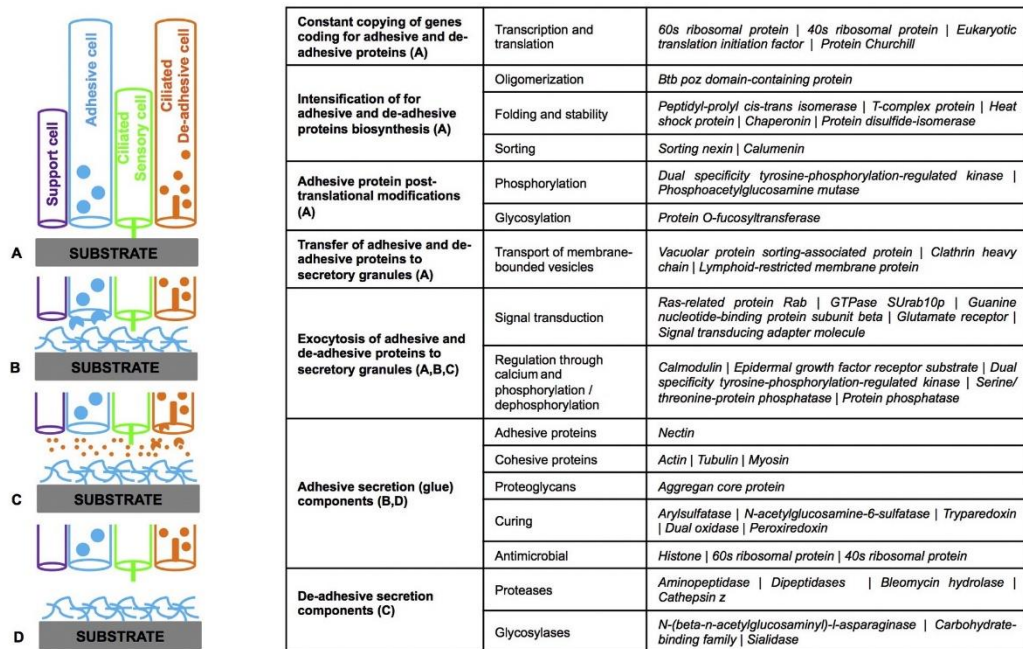


Figura 1.8 – Modelo molecular da adesão reversível do ouriço do mar e principais intervenientes. As proteínas estão divididas em grupos de acordo com a sua função e envolvimento nas várias etapas de adesão: **A** – antes da adesão; **B** – durante a adesão; **C** – durante a “desadesão”; **D** – Após a “desadesão” (Adaptado de Lebesgue *et al.* 2016).

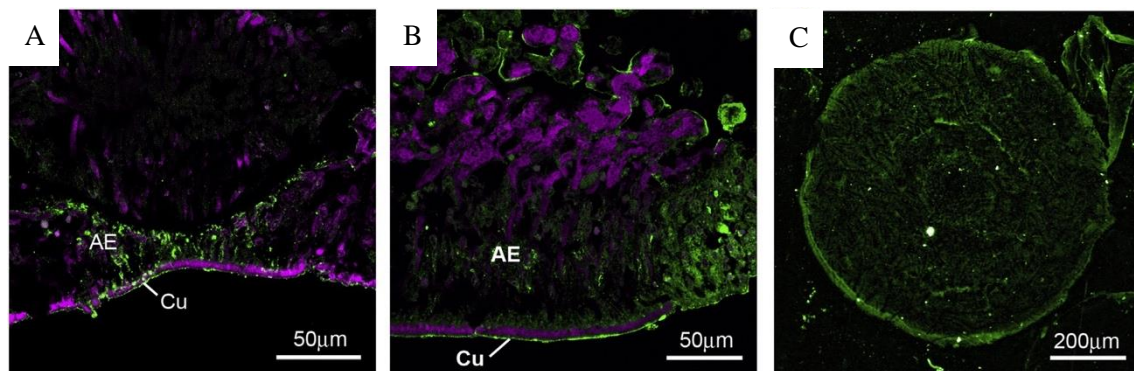


Figura 1.9 – Imunolocalização da proteína adesiva Nectina nos pés ambulacrários do ouriço do mar *P. lividus* e no adesivo secretado. Marcação com anticorpo específico para a Nectina dos ovos/embriões de *P. lividus* (Q70JA0) e observação por microscopia confocal (núcleos a rosa e imunomarcação a verde). A imunomarcação foi detetada na zona central (**A**) e periférica (**B**) da epiderme adesiva, bem como no adesivo secretado (**C**). Legendas: AE - epiderme adesiva; Cu – cutícula. (Adaptado de Lebesgue *et al.* 2016).

1.3. Comparação do adesivo dos ouriços do mar com outros bioadesivos marinhos

Nos organismos marinhos o recurso à secreção de adesivos é muito comum. A adesão no mundo marinho pode ser permanente, transitória, temporária ou instantânea. A fixação das cracas ou dos mexilhões às rochas é do tipo permanente, porque secretam um cimento que os mantém fixos ao mesmo local permanentemente. Já as lapas apresentam um tipo de adesão transitória, produzindo secreções adesivas com graus variáveis de viscosidade que lhes permitem fixar-se firmemente ao substrato, mas também moverem-se. Existem ainda outros organismos como os equinodermes que se fixam firmemente

ao substrato, mas de forma temporária ou reversível, produzindo dois tipos de secreção, para se colarem e descolarem repetidamente. A adesão pode também ser usada como estratégia de defesa, como é o caso de alguns pepinos do mar que usam a adesão instantânea para imobilizar os predadores (Figura 1.10) (Tyler 1988, Whittington & Cribb 2001, Flammang *et al.* 2005, Lengerer & Ladurner 2018).

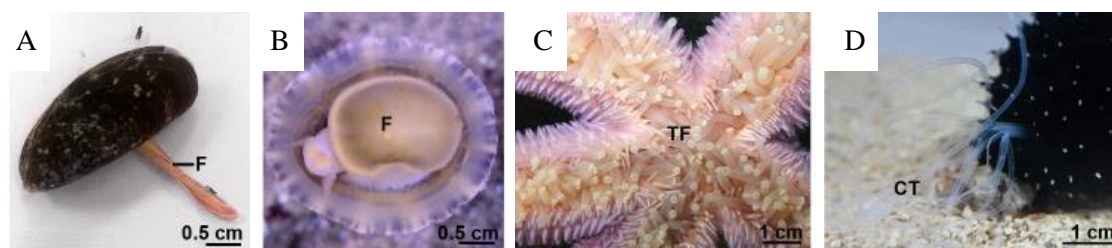


Figura 1.10 – Organismos que representam os diferentes tipos de adesão. **A** – Adesão permanente (mexilhão *Mytilus edulis*); **B** – Adesão transitória (lapa *Patella vulgata*); **C** – Adesão temporária ou reversível (estrela do mar *A. rubens*); **D** – Adesão instantânea (pepino do mar *H. forskali*). Abreviaturas: F – pé; TF – pés ambulacrários; CT – túbulos de Cuvier. (Adaptado de Hennebert *et al.* 2018).

Tipicamente, os adesivos permanentes possuem tenacidades superiores do que os adesivos não permanentes (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Tenacidade média de vários adesivos sintéticos e biológicos. Abreviaturas: NA, não se aplica. (Adaptado de Flammang *et al.* 2016)

Tipo de adesivo		Tenacidade (MPa) (força de adesão/unidade de área)	Tipo de adesão	Referência
Adesivos comerciais	Cianoacrilato	13-21	NA	Ebnesajjad & Landrock 2015
	Fibrina	0.002–0.04	NA	Chivers & Wolowacz 1997
Bioadesivos marinhos	Cracas	0.08 – 0.52	Permanente	Yule & Walker 1987
	Mexilhão	0.12 – 0.75	Permanente	Waite 2002
	Lapa	0.17 – 0.23	Transitória	Grenon & Walker 1981
	Ouriço do mar	0.09 – 0.54	Reversível	Santos <i>et al.</i> (2005a) Santos & Flammang (2006) Santos & Flammang (2008)
	Estrela do mar	0.17 – 0.43	Reversível	Flammang & Walker (1997) Hennebert <i>et al.</i> (2010) Santos <i>et al.</i> (2005) Paine (1926)
	Pepinos do mar	0.03 – 0.14	Instantânea	Flammang <i>et al.</i> 2002

A força de adesão dos adesivos marinhos está relacionada com a sua composição química, que varia consoante o tipo de adesão (Flammang 2006). Os adesivos permanentes são compostos quase

exclusivamente por proteínas. Já os adesivos não permanentes (como o adesivo reversível dos ouriços do mar) são compostos maioritariamente por proteínas e glícidos, sendo o seu rácio normalmente de 2:1 nos adesivos temporários e 3:2 nos adesivos instantâneos. Estes adesivos têm ainda em comum a presença de uma importante fração inorgânica (Flammang *et al.* 2016).

Todos os adesivos marinhos caracterizados até à data, têm uma fração proteica rica em aminoácidos de cadeia lateral pequena, e aminoácidos polares com carga (Flammang 1996). Este tipo de aminoácidos confere aos adesivos alta resistência e coesão adesiva. Os adesivos dos equinodermes, têm em comum a predominância de alguns aminoácidos (alanina, valina, treonina, glicina, glutamato/ácido glutâmico, aspartato/ácido aspártico), mas as estrelas do mar têm mais resíduos com carga, os ouriços do mar têm mais resíduos hidrofóbicos e os pepinos do mar têm mais resíduos de glicina (Figura 1.11) (Flammang *et al.* 2016).

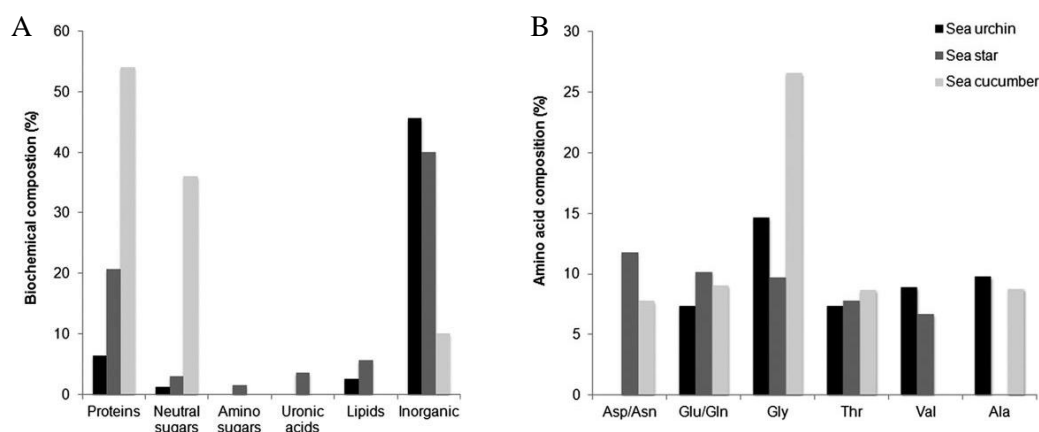


Figura 1.11 – Análise comparativa da composição bioquímica (A) e das proporções dos 6 aminoácidos mais abundantes (B) nos adesivos da estrela do mar *A. rubens*, do ouriço do mar *P. lividus* e do pepino do mar *H. forskali* (Adaptado de Flammang, *et al.* 2016)

Já foram também realizados estudos de caracterização da fração glicídica em diversos organismos marinhos que produzem secreções adesivas. Foram identificadas glicoproteínas no adesivo reversível da estrela do mar (*A. rubens*), assim como proteoglicanos. Tanto as glicoproteínas como os proteoglicanos parecem conter em maior abundância resíduos de manose, galactose e ácido siálico, e em menor abundância resíduos de N-acetilgalactosamina e fucose (Hennebert *et al.* 2011). Já no adesivo de 2 espécies de platelmintes identificou-se, uma glicoproteína com resíduos de galactose (β -1,3) N-acetilgalactosamina (*Macrostoma lignano*) e resíduos de glucose, N-acetilglucosamina, galactose e N-acetilgalactosamina livres ou conjugados (*Minona ileanae*) (Lengerer *et al.* 2016, Wunderer *et al.* 2019, Pjeta *et al.* 2019).

1.4. Vantagens dos bioadesivos marinhos e possíveis aplicações

Hoje em dia os adesivos sintéticos existentes são na sua maioria feitos a partir do petróleo, sendo tóxicos, cancerígenos, alergénicos e prejudiciais para o ambiente. Um dos adesivos sintéticos mais utilizados é o cianoacrilato (ex. Supercola) sendo este possivelmente cancerígeno uma vez que se degrada em meio aquoso causando inflamação (Ferreira *et al.* 2013). No entanto, tem a vantagem de possuir elevada força adesiva (ver Tabela 1.2).

Também existem atualmente adesivos biológicos disponíveis no mercado. Os adesivos à base de fibrina foram desenvolvidos para aplicações médicas, com a finalidade de reproduzir os estádios finais da coagulação. O coágulo resultante ajuda na selagem dos tecidos e é completamente absorvido durante a cicatrização de feridas (Brennan, 1991). No entanto, estes adesivos apresentam várias limitações, tais como: baixa força adesiva (Tabela 1.2), imunogenicidade e o risco de transmissão de

doenças pelo sangue, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) (Ferreira *et al.* 2013, Lengerer & Ladurner 2018).

Comparativamente, os adesivos marinhos, têm forças de adesão menores que os adesivos sintéticos, mas maiores que a fibrina (ver Tabela 1.2), com as vantagens acima referidas dos adesivos biológicos e demonstrada eficácia em meios aquosos e em vários substratos naturais e artificiais. Este potencial tem feito crescer o interesse em desenvolver novos adesivos biomiméticos para aplicações industriais e médicas, mas para tal é necessário decifrar as propriedades funcionais e os mecanismos moleculares dos bioadesivos.

1.5. Objetivos

Devido ao crescente interesse por adesivos biomiméticos, este projeto pretende dar uma contribuição nesse sentido, tendo como principal objetivo caracterizar os glúcidos presentes no adesivo secretado pelo ouriço do mar *P. lividus*, recorrendo a uma bateria de 22 lectinas, aplicadas a 3 metodologias complementares.

Até à data apenas se sabe que a secreção adesiva é composta por 1.2% de glúcidos neutros (os restantes tipos de glúcidos não foram quantificados) e por proteínas que podem encontrar-se glicosiladas, estando estas envolvidas na adesão do ouriço do mar *P. lividus* (Hennebert *et al.* 2015). Como anteriormente referido, a proteína Nectina, foi imuno-localizada nas células adesivas do disco e no adesivo secretado, e possui isoformas glicosiladas e fosforiladas (Santos *et al.* 2013, Lebesgue *et al.* 2016).

As modificações pós-tradução (do inglês *Post-translational modifications* - PTMs) são uma particularidade comum a muitas proteínas adesivas, sendo geralmente de três tipos: glicosilação, hidroxilação e fosforilação (Hennebert *et al.* 2015).

Neste projeto iremos focar-nos apenas na glicosilação, ou seja, na adição de glúcidos a aminoácidos específicos. A N- ou O-glicosilação acontece no retículo endoplasmático, ocorrendo o processamento dos glúcidos no aparelho de Golgi (Alberts *et al.* 2002).

O estudo de glicoproteínas e glúcidos livres é complexo devido à grande variedade de combinações possíveis, e à possibilidade de os glúcidos se encontrarem covalentemente ligados ou não às proteínas (Roth *et al.* 2012, Hennebert *et al.* 2015). Já foram aplicados vários métodos para o estudo da glicosilação nos bioadesivos, como a histoquímica com lectinas; separação de proteínas seguida de coloração ou transferência de glicoproteínas e sua deteção por *lectin blotting*; e a análise da estrutura do glícido por espectrometria de massa (Hennebert *et al.* 2015).

A deteção de glicoproteínas por coloração é um método simples que permite determinar se alguma proteína se encontra glicosilada. Primeiramente é feita uma eletroforese unidimensional ou bidimensional e de seguida cora-se o gel. A coloração do gel pode ser efetuada de várias formas, a maioria das colorações tem por base uma reação do ácido periódico-Schiff originando uma cor magenta (Hennebert *et al.* 2015). Esta coloração já foi usada para demonstrar a presença de treoninas O-glicosiladas na proteína Pvfp-1 do mexilhão *Perna viridis* (Ohkawa *et al.* 2004).

A deteção de glicoproteínas também pode ser realizada utilizando lectinas, ou seja, moléculas que se ligam especificamente a mono- ou oligossacarídeos, permitindo a deteção e caracterização de glicoproteínas através da histoquímica e/ou da sua separação e transferência para uma membrana (i.e. *lectin blotting*). Esta estratégia foi utilizada com sucesso para demonstrar a presença de glúcidos livres e conjugados no adesivo secretado pela estrela do mar *A. Rubens*, e por 2 platelmintos *M. lignano* e *M. ileanae* (Hennebert *et al.* 2011, Wunderer *et al.* 2019, Pjeta *et al.* 2019).

Confirmada a glicosilação da proteína pode ainda ser feita a análise da estrutura do glícido por cromatografia líquida e espectrometria de massa. A cromatografia líquida é frequentemente acoplada à espectrometria de massa para a elucidação da sequência, ramificação e ligação do glícido (Pagett *et al.* 2012). A espectrometria de massa permite a análise da fração de proteínas da qual o glícido foi removido,

para que seja possível identificar os aminoácidos que anteriormente estavam ligados aos glúcidos (Hennebert *et al.* 2015).

Assim os objetivos específicos deste projeto foram:

- 1) Quantificar os glúcidos (livres e/ou conjugados) presentes em extratos proteicos dos discos (zona adesiva) *versus* caules (zona não adesiva) dos pés ambulacrários, utilizando a técnica ELLA (do inglês *Enzyme-Linked Lectin Assay*);
- 2) Identificar as glicoproteínas presentes apenas nos extratos proteicos dos discos (zona adesiva), através da separação de proteínas por SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate polyacrylamide Gel Electrophoresis*), posterior transferência para membranas de PVDF (do inglês *Polyvinylidene fluoride*) e detecção com lectinas (*Lectin blotting*);
- 3) Localizar os glúcidos (livres e/ou conjugados) previamente identificados nos tecidos dos pés ambulacrários e na matriz do adesivo, com recurso à histoquímica com lectinas.

2. Material e métodos

Neste projeto foram utilizadas três metodologias para a detecção de glícidos, ELLA, *lectin blotting* e histoquímica com lectinas, que permitiram de uma forma sequencial, recorrendo a uma bateria de 22 lectinas, identificar os glícidos presentes nos pés ambulacrários e no adesivo do ouriço do mar *P. lividus*. As técnicas de *lectin blotting* e histoquímica com lectinas já tinham sido aplicadas com sucesso na caracterização de outros bioadesivos marinhos (Hennebert *et al.* 2015), mas foram neste projeto aplicadas pela primeira vez na caracterização dos glícidos presentes nos bioadesivos produzidos pelos ouriço do mar. A técnica ELLA foi aplicada pela primeira vez para caracterizar os glícidos presentes num órgão adesivo. Permitindo assim perceber qual ou quais as lectina(s) que marcaram unicamente os discos. Estes ensaios foram realizados em microplacas de modo a testar um conjunto de 22 lectinas nos dois extratos. (Thompson *et al.* 2011)

Todas estas técnicas utilizam lectinas, ou seja, proteínas de origem não imune que reconhecem e se ligam especificamente a mono- ou oligossacáridos livres ou conjugados com proteínas (ex. glicoproteína) ou outras biomoléculas (ex. glicolípido). A especificidade das lectinas para certos glícidos ocorre através de ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas e forças de *Van der Waals*. As regiões hidrofóbicas das lectinas interagem com os grupos hidroxilo dos glícidos, que devido ao seu arranjo espacial criam locais hidrofóbicos. Muitas das lectinas atualmente conhecidas já foram caracterizadas quanto à sua especificidade de ligação a um glícido, tornando possível identificar o estado de glicosilação de uma glicoproteína ou de um glicoconjugado (Sharon & Lis 2002, Thompson *et al.* 2011).

2.1. Recolha de ouriços do mar e sua manutenção em aquário

A recolha dos ouriços do mar da espécie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) foi feita na Ericeira, mais precisamente na Praia do Matadouro, em maré-baixa (Figura 2.1A).

Os indivíduos recolhidos foram rapidamente transferidos para um aquário com água do mar artificial (Figura 2.1B), onde regularmente foi controlada a temperatura, salinidade, e parâmetros que garantem a qualidade da água (amónia, nitritos e nitratos) e consequentemente o bem-estar dos animais. Foram alimentados regularmente com algas desidratadas e milho.

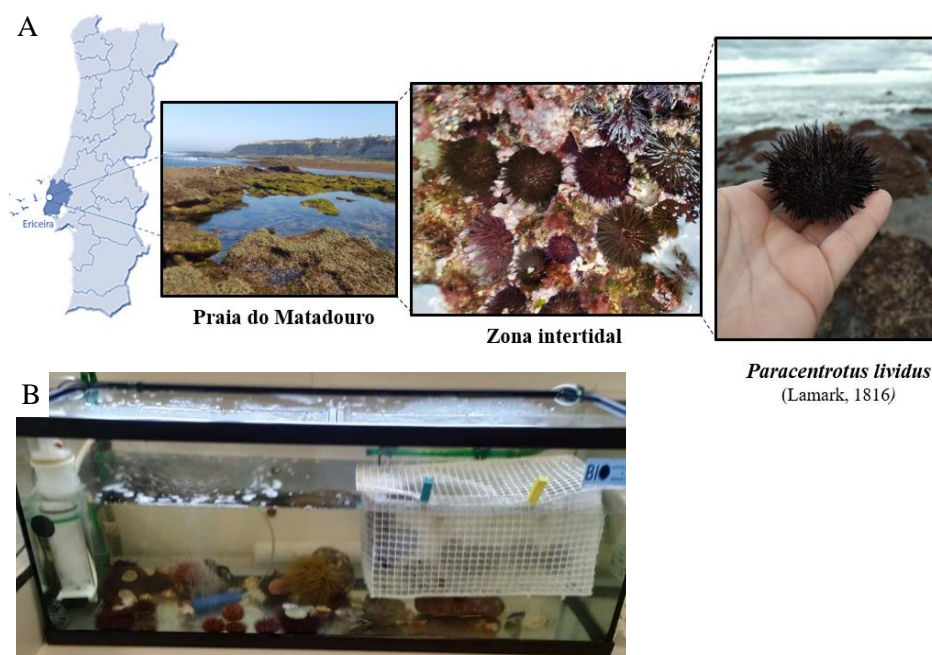


Figura 2.1 – Habitat natural dos ouriços do mar *P. lividus* na Praia do Matadouro (A) e habitat artificial em aquário de água salgada recriado no laboratório (B).

2.2. Recolha de amostras

Neste projeto foram utilizados dois tipos de amostras: pés ambulacrários e o adesivo secretado pelos ouriços do mar *P. lividus*.

2.2.1. Recolha de pés ambulacrários

Os pés ambulacrários foram recolhidos colocando os ouriço do mar em pequenos aquários, com a cavidade oral virada para cima, de forma a permitir o corte dos órgãos adesivos pela sua base, ou seja, junto à carapaça, com recurso a tesoura e pinça.

Para as experiências de histoquímica os pés ambulacrários foram imediatamente colocados no fixador apropriado (ver 2.7.1)

Para os ensaios ELLA e *lectin blotting*, efetuou-se a separação dos discos (parte adesiva) e dos caules (parte não adesiva) recorrendo a uma lupa e bisturi (Figura 2.2A). Estas amostras foram armazenadas a -20 ° C até serem utilizadas.

2.2.2. Recolha de adesivo

Uma vez que é um processo demoroso e de baixo rendimento, foi apenas utilizada a secreção adesiva para os ensaios de histoquímica e alguns ensaios de *lectin blotting*.

Para as experiências de histoquímica, os ouriço do mar foram colocados em pequenos aquários, com a cavidade oral virada para cima, para induzir a adesão dos pés ambulacrários a lâminas de microscópio (Figura 2.2B). Estas amostras foram lavadas abundantemente com água destilada e imediatamente processadas (ver 2.7.1).

Para os ensaios ELLA e *lectin blotting*, os ouriços do mar foram mantidos dentro do aquário grande em cestos de rede, no fundo dos quais se colocaram placas de Petri de vidro durante um período de cerca de 24 horas (Figura 2.2C). No dia seguinte foram retiradas do aquário, lavadas abundantemente com água destilada, secas ao ar e raspadas com um bisturi, obtendo-se um pó fino. O adesivo recolhido foi armazenado a -20 ° C até ser utilizado.

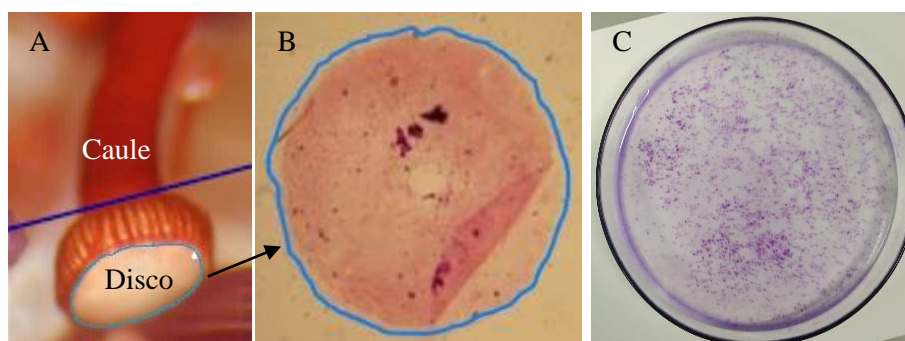


Figura 2.2 – Pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus* mostrando o local onde foi seccionado para separar o disco (zona adesiva) do caule (zona não adesiva) (A). Círculo de adesivo fixo a lâmina de microscópio, e corados com uma solução aquosa de 0.05% de corante violeta cristal e observado por microscopia ótica (B). Múltiplos círculos adesivos fixos a uma caixa de Petri de vidro e corados com uma solução aquosa de 0.05% de corante violeta cristal (C). Imagens fornecidas por Romana Santos.

2.3. Extração de proteínas

2.3.1. Extração de proteínas dos pés ambulacrários

Para os ensaios ELLA e *lectin blotting* é necessário extrair proteínas das amostras de discos e caules. Para tal, adicionou-se tampão RIPA (150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 0.5% desoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) correspondente a cerca do dobro do volume de tecido, ao qual se juntou um cocktail inibidor de proteases e fosfatases numa diluição de 1:10000 (Sigma). Para além de uma lise química efetuou-se também uma lise mecânica. Para tal, foram adicionadas 8 esferas de

metal com 5 mm de diâmetro aos tubos contendo as amostras e o tampão, e estes foram colocados num moínho de esferas (Retsch) durante 10 minutos a 100% de velocidade. Por fim, as esferas foram removidas e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e conservado a -20°C até ser utilizado.

2.3.2. Extração de proteínas do adesivo secretado

Para alguns ensaios *lectin blotting* utilizou-se também extratos do adesivo secretado. Para obter a melhor solubilização possível do adesivo foram testados 3 tampões, utilizando cerca de 3 mg de adesivo em cada ensaio. O adesivo recolhido como anteriormente explicado (ver 2.2.2), foi previamente lavado com 1 ml água Milli-Q e seguidamente centrifugado a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi novamente lavado mais quatro vezes.

Tampão 1 - Tris-HCl 63.2 mM, 2% SDS, 0.5 M DTT, pH 6.8

Este tampão foi anteriormente utilizado com sucesso para solubilizar o adesivo de *P. lividus* (Santos *et al.* 2009a). Têm um pH fisiológico e baseia-se na presença de grandes quantidades de agentes desnaturantes (dodecil sulfato de sódio - SDS) e redutores (dithiothreitol - DTT) para solubilizar o adesivo. Requer uma precipitação inicial das proteínas com 10% de ácido trifluoroacético (TCA) e 0.07% β-mercaptoetanol, durante 90 min a 4°C. De seguida a amostra foi lavada com 0.07% β-mercaptoetanol em acetona, e centrifugada a 14000 rpm durante 20 min, a 4°C. Este processo foi repetido mais duas vezes. O precipitado resultante foi solubilizado com 150 µl do tampão 1 (Tris-HCl 63.2 mM, 2% SDS, 0.5 M DTT, pH 6.8), com agitação (800 rpm) durante 3 h, a 60°C. Por fim, centrifugou-se a 14000 rpm durante 20 min, a 4°C e o sobrenadante foi recolhido e conservado a -20°C. O precipitado secou durante a noite a 37°C e o seu peso foi registado no dia seguinte para aferir a eficácia da solubilização.

Tampão 2 - Tris-HCl 1.5 M, 7 M GndHCl, 20 mM EDTA, 0.5 M DTT 0.5, pH 8.5

Este tampão foi anteriormente utilizado com sucesso para solubilizar o adesivo da estrela do mar *A. rubens* (Hennebert *et al.* 2012). Tem um pH mais básico, contém também grandes quantidades de agentes redutores (DTT), mas inclui um agente desnaturante diferente (cloreto de guanidina - GndHCl) e também um agente quelante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). Para testar a eficácia deste tampão na solubilização do adesivo de *P. lividus* foi adicionado aos 3 mg de amostra, 200 µl do tampão 2 (Tris-HCl 1.5 M, 7 M GndHCl, 20 mM EDTA, 0.5 M DTT 0.5, pH 8.5). Este foi incubado com agitação (800 rpm) durante 1 h, a 60°C. Seguidamente foi-lhe adicionado iodoacetamida (agente de alquilação) e a amostra foi incubada no escuro durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se β-mercaptoetanol para parar a reação, e o extrato foi centrifugado a 14000 rpm durante 20 min, a 4°C, sendo recolhido o sobrenadante e conservado a -20°C. O precipitado secou durante a noite a 37°C e o seu peso foi registado no dia seguinte para aferir a eficácia da solubilização.

Tampão 3 - 8M Ureia, 2% SDS, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, pH 4.3

Este tampão é geralmente utilizado para extrair proteínas para posterior separação por eletroforese bidimensional (Rabilloud *et al.* 1997). Têm um pH ácido e contém dois agentes desnaturantes (ureia e SDS), e dois detergentes (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol, t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether – Triton X 100 e 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio) -1-propanesulfonate – CHAPS). Aos 3 mg de adesivo foi adicionado 200 µl do tampão 3 (8M Ureia, 2% SDS, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, pH 4.3), e este foi incubado com agitação (800 rpm) durante 1 h a 60°C. Seguidamente, centrifugou-se a 14000 rpm, 20 min, a 4°C, e recolheu-se o sobrenadante que foi conservado a -20°C. O extrato foi centrifugado a 14000 rpm, durante 20 min, a 4°C, e recolheu-se o sobrenadante que foi conservado a -20°C. O precipitado

secou durante a noite a 37°C e o seu peso foi registado no dia seguinte para aferir a eficácia da solubilização.

Para verificar a eficácia dos três tampões de solubilização testados, recolheu-se também adesivo diretamente em lâminas de microscópio (ver 2.2.2) e estas foram coradas com uma solução aquosa 0.05% de violeta cristal. Após confirmação da presença do adesivo, as lâminas foram incubadas com agitação durante 3 h com os diferentes tampões. De seguida, o tampão foi removido e as lâminas coradas novamente com violeta cristal, de modo a averiguar a presença ou ausência de adesivo nas mesmas.

2.4. Quantificação de proteínas

A concentração total de proteína presente nas amostras foi determinada através do ensaio colorimétrico de Bradford. Este ensaio baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G250 às proteínas, mais concretamente aos resíduos de aminoácidos e às suas bases aromáticas (Chial *et al.* 1993). Assim a quantidade de proteína é estimada determinando a quantidade de corante que se liga às proteínas através da medição da absorbância da solução a 595 nm (Kruger 2009) e utilizando como proteína padrão a albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin* (BSA)). O ensaio foi efetuado em microplaca de 96 poços (BRAND), à qual foi adicionado 10 µl das diferentes concentrações da proteína padrão (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5 µg/µl, Sigma) e das amostras (discos, caules e adesivo) sempre em triplicado. Seguidamente, adicionou-se 200 µl do reagente de Bradford (Bio-Rad) a cada um dos poços com proteína padrão e amostra, e incubou-se a microplaca durante 20 min a temperatura ambiente. Por fim, fez-se a leitura das absorvâncias num espectrofotómetro (Bio Tek Synergy HT) a um comprimento de onda de 595 nm (Figura 2.3). Obteve-se assim uma reta de calibração que relaciona a concentração da proteína padrão com a absorvância e a partir da qual podemos calcular a concentração de proteína nas amostras.

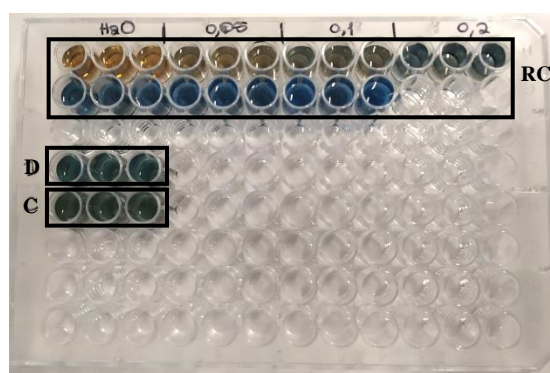


Figura 2.3 – Quantificação de proteínas através do ensaio colorimétrico de Bradford. Abreviaturas: RC – reta de calibração, D – discos, C – caules.

2.5. Enzyme-Linked Lectin Assay (ELLA)

O método ELLA é um ensaio com o mesmo formato que o ensaio ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), mas que permite a análise de glícidos (livres e/ou conjugados) através da sua interação com lectinas (Figura 2.4). Este ensaio já foi efetuado com sucesso na identificação de potenciais biomarcadores glicídicos de cancro, assim como na identificação de desenvolvimentos de tumores em biópsias de tecidos (Wi *et al.* 2016, Hashim *et al.* 2017).

O ELLA requer a imobilização de glícidos na superfície da placa e posterior bloqueio, para evitar falsos positivos devido a ligações inespecíficas das lectinas. O álcool polivinílico foi utilizado como solução de bloqueio, uma vez que este impede as interações inespecíficas com a superfície da placa, e não interfere na capacidade das lectinas interagirem com as glicoproteínas imobilizadas (Thompson *et al.* 2011). Após bloqueio, adiciona-se a lectina biotinilada, à qual se liga um enzima conjugado com streptavidina e o substrato específico, seguido da leitura de absorvâncias a 450 nm

(Figura 2.4C). Este método permite-nos obter uma estimativa da abundância de glúcidos (livres e/ou conjugados) presentes nas amostras. Em alguns poços, utilizou-se também a lectina inibida com o respetivo glícido de modo a controlar os falsos positivos. Para controlar o *background*, em alguns poços não foi adicionado qualquer tipo de amostra, permitindo assim medir a absorvância causada apenas pela presença da lectina, do enzima e do substrato. Este ensaio tem a vantagem de ser de fácil execução, ser rentável e de requerer quantidades reduzidas de amostra. No entanto tem como desvantagem não permitir a distinção entre glúcidos livres e conjugados.

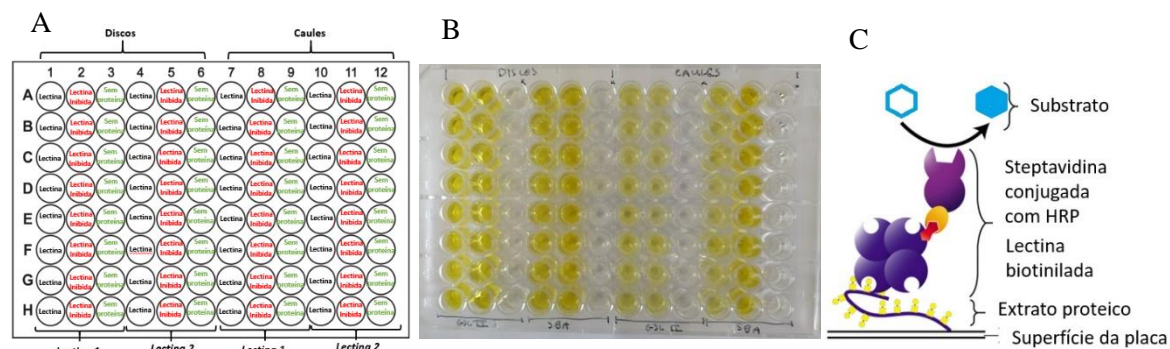


Figura 2.4 – Esquema (A) e resultado final (B) de um ensaio ELLA utilizado para determinar os glúcidos presentes em amostras de discos (zona adesiva) e caules (zona não adesiva). Esquema da sequência de reações que ocorrem no ensaio ELLA (C). Adaptado de Hashim *et al.* 2017.

Para os ensaios ELLA foram utilizados extratos obtidos a partir dos discos e dos caules dos pés ambulacrários (ver 2.3.1), uma vez que em termos histológicos são idênticos com exceção da presença de uma epiderme adesiva duo-glandular (i.e. com células adesivas e “desadesivas”) nos discos, que está ausente nos caules. Esta abordagem foi escolhida em detrimento do uso de extratos de adesivo, uma vez que este último é muito difícil de recolher em grandes quantidades e de difícil solubilização.

Os extratos proteicos (discos e caules) foram adsorvidos a uma microplaca de 96 poços (BRAND) (Figura 2.4A) adicionando-se 1 µg por poço, e deixando incubar durante a noite a 4°C. No dia seguinte, o extrato proteico não adsorvido foi removido por inversão da microplaca, e foram adicionados 150 µl da solução de bloqueio (0.5 % álcool polivinílico em tampão fosfato) a todos os poços, seguindo de uma incubação da placa durante 2 h à temperatura ambiente. De seguida, removeu-se a solução de bloqueio por inversão da microplaca e aplicaram-se 200 µl da solução de lavagem (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, denominado doravante por TBS-T-ões) a todos os poços, e a placa foi incubada durante 5 min a temperatura ambiente. Removeu-se a solução de lavagem por inversão da microplaca e este processo foi repetido mais duas vezes. Adicionou-se de seguida 50 µl de lectina biotinizada (nos poços denominados lectina e sem proteína, ver Figura 2.4A) e de lectina inibida (com o respetivo glícido, ver Tabela Suplementar 7.1), e a microplaca foi incubada durante 1 h a 37°C. Depois, todas as soluções foram removidas por inversão da microplaca e aplicaram-se 200 µl da solução de lavagem, procedendo como anteriormente descrito. Foi adicionado em todos os poços 50 µl de uma solução de enzima conjugada com streptavidina (*Horseradish peroxidase streptavidine*, Vector) diluída numa razão de 1:40000 em TBS-T-ões, esta foi incubada durante 1 h a 37°C. Por inversão da microplaca foi removida esta solução e aplicaram-se 200 µl da solução de lavagem, procedendo como anteriormente descrito. Seguidamente, foram aplicados 100 µl de uma solução de substrato (1-Step Ultra TMB ELISA, Thermo) em todos os poços, e incubou-se à temperatura ambiente até que se note o aparecimento de uma coloração azul (aproximadamente 10-30 min). Para parar a reação adicionaram-se 50 µl de uma solução de 2 M de ácido sulfúrico em todos os poços da microplaca, convertendo a coloração de azul para

lectina biotinilada (em solução de TBS-T, ver concentrações na Tabela Suplementar 7.1) durante 1h30, à temperatura ambiente e com agitação. Seguiram-se 5 lavagens de 10 min com TBS-T e incubou-se a membrana com uma solução de enzima conjugada com streptavidina (*Horseradish peroxidase streptavidin*, Vector) numa diluição de 1:5000 em TBS-T-BSA. Realizaram-se mais 5 lavagens idênticas às anteriores e por fim, a membrana foi revelada utilizando um substrato quimiluminescente (peróxido de hidrogénio conjugado com luminol - ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham GE) e fotografada no equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

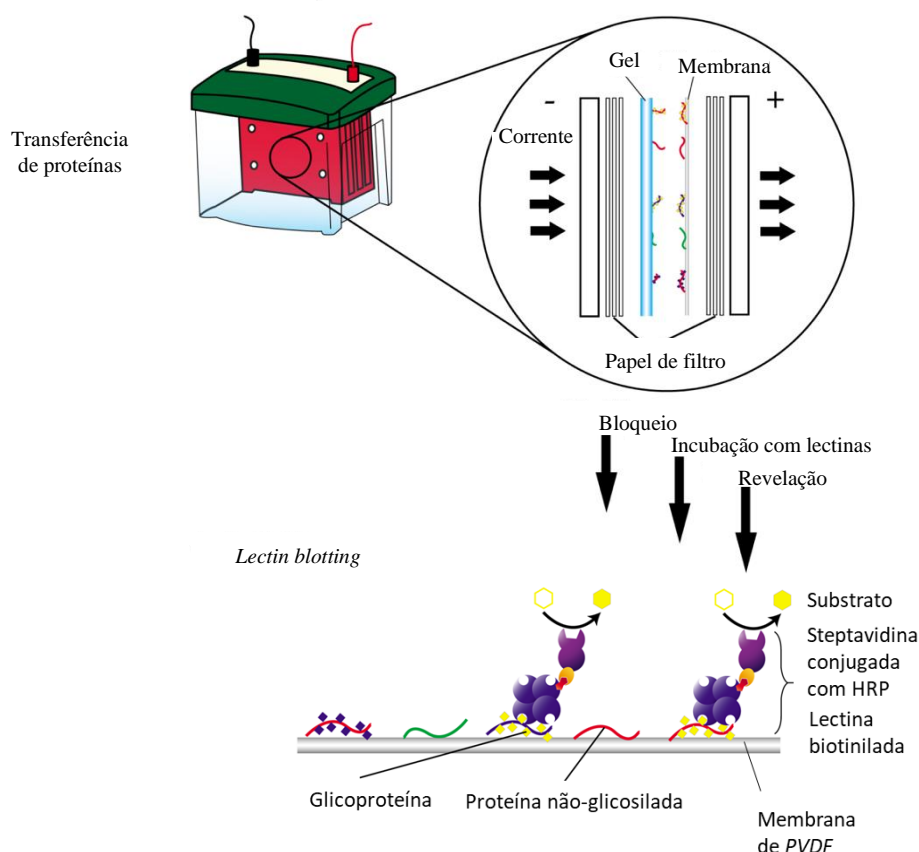


Figura 2.6 – Esquema do procedimento do *Lectin blotting*. Adaptado de Hashim *et al.* 2017.

2.7. Histoquímica com lectinas

A histoquímica de lectinas baseia-se essencialmente em duas características das lectinas: na especificidade destas detetarem determinados resíduos de glícidos e na capacidade de se ligarem a diferentes marcadores. Esta técnica tem a vantagem de preservar os tecidos e as células (Danguy *et al.* 1988), de nos permitir validar os resultados obtidos pelas outras técnicas e de localizar os glícidos nos tecidos dos pés ambulacrários e na matriz do adesivo. Nesta técnica são utilizadas lectinas biotiniladas, sendo que a biotina da lectina é reconhecida por uma solução de streptavidina que se encontra conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor 488 [λ_{exc} = 488 nm (azul), λ_{emi} = 530 nm (verde)] (Figura 2.7).

2.7.1. Imunohistoquímica com lectinas

Os pés ambulacrários foram recolhidos (ver 2.2.1) e fixados em 2% de paraformaldeído (PFA) em 0.12 M de tampão fosfato com 4% sacarose, durante 4 h. De seguida, adicionou-se a solução de descalcificação (1:1 2% ácido ascórbico : 0.3 M cloreto de sódio) e incubou-se durante 24 h, à temperatura ambiente e agitação, tendo sido a solução trocada várias vezes. De seguida, os pés ambulacrários foram lavados 3 vezes com PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*). A estes

adicionou-se uma solução com 0.12 M de tampão fosfato com 4% sacarose e incubou-se durante 6 h a 4°C. Os pés ambulacrários foram lavados 3 vezes com PBS e foi adicionada uma solução com 0.12 M de tampão fosfato com 15% sacarose e incubou-se durante a noite a 4°C. No dia seguinte, os pés ambulacrários foram mudados para uma solução de 0.12 M de tampão fosfato com 15% de sacarose e 7.5% de gelatina (Sigma), e incubados durante 1 h num banho a 37°C em pequenas placas de Petri. As placas de Petri foram retiradas do banho e incubadas a 4°C, para induzir a solidificação da gelatina. Por fim, a gelatina foi cortada em pequenos paralelepípedos (cortes ortogonais) com a ajuda de um bisturi e de uma pinça, e estes foram congelados em isopentano (Fisher Chemical) refrigerado com gelo seco e conservados a -80°C até serem utilizados.

Para secionar os pés ambulacrários, foram efetuados cortes de 15 µm no criostato (Leica Cryostat CM1860 UV), e colocados em lâminas SuperFrost-Plus (Thermo), que foram armazenadas a -20°C até uso posterior. Antes de proceder com o protocolo de histoquímica as lâminas foram retiradas do congelador e colocadas à temperatura ambiente durante a noite.

Seguidamente, as lâminas (contendo secções de pés ambulacrários ou círculos de adesivo) foram incubadas com solução de bloqueio (TBS-T-BSA) durante 2 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com lectina biotinilada diluída (ver diluições na Tabela Suplementar 7.1) em TBS-T-BSA suplementada com iões (5 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM ZnCl₂), ou no caso das lâminas controlo apenas com TBS-T-BSA, durante 2 h à temperatura ambiente. Realizaram-se de seguida 3 lavagens de 10 min com TBS-T e incubou-se as lâminas com streptavidina conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluída (ver diluições na Tabela Suplementar 7.1) em TBS-T-BSA, durante 1 h a temperatura ambiente, isoladas da luz. Após este tempo, realizaram-se mais 3 lavagens de 10 min com TBS-T e incubaram-se as lâminas com DAPI (4', 6 diamidino-2-pheylindole, Invitrogen) durante 1 min, no escuro. Por fim, realizaram-se as últimas 3 lavagens de 10 min com PBS e efetuou-se a montagem das lâminas com meio de montagem (Vectashield, Vector). As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência (BX60, Olympus) num comprimento de onda de 488 nm.

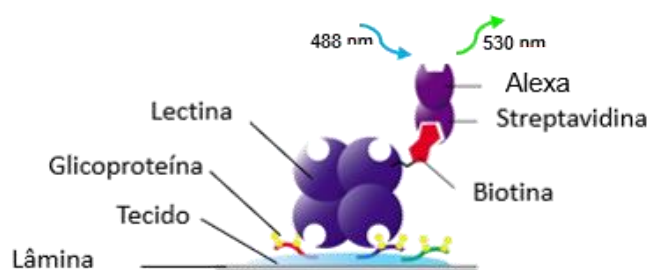


Figura 2.7 –Esquema do procedimento da histoquímica de lectinas. Adaptado de Hashim *et al.* 2017.

2.8. Colorações

As colorações são importantes para os estudos histológicos porque permitem a distinção entre os diferentes tipos de tecido. A coloração Tricrómio de Masson e a coloração com azul de Alcian foram as utilizadas neste projeto.

A coloração Tricrómio de Masson destina-se ao estudo do tecido conjuntivo, fibras musculares e fibras de colagénio, permitindo, portanto, distinguir o colagénio do tecido muscular (Williams & Wilkins 1977). Os tecidos são primeiramente incubados com solução de Bouin para intensificar a coloração final. De seguida, os núcleos das células são corados com a hematoxilina férrica adquirindo uma cor acastanhada. O citoplasma e o músculo são corados com Biebrich scarlet - Fucsina ácida adquirindo uma cor avermelhada. O tratamento com ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, permite que as fibras de colagénio fiquem marcadas a azul. Após a coloração, a incubação com ácido acético torna os tons de cor mais transparentes (Gomori 1950).

A coloração azul *Alcian* destina-se a marcação histológica de glicídios ácidos sulfatados e carboxilados e sialomucinas sulfatadas e carboxiladas (glicoproteínas). Os tecidos são primeiramente incubados com azul Alcian que deteta os glicídios marcando-os de azul, seguido de uma coloração com um corante nuclear para que os núcleos adquiram uma cor contrastante.

2.8.1. Coloração Tricrómio de Masson

Após a recolha dos pés ambulacrários como explicado no ponto 2.2.1., estes foram fixados em solução de *Bouin* (não acético) durante 24 horas a 4°C. De seguida, adicionou-se a solução de descalcificação (1:1 2% ácido ascórbico : 0.3 M cloreto de sódio) e incubou-se durante 24 horas, à temperatura ambiente e com agitação. Procedeu-se depois à desidratação gradual dos pés ambulacrários, primeiramente em álcool a 70% durante 24 horas, seguido de duas incubações de 1 h em álcool a 90%, uma incubação em butanol, durante 1 h e por fim, uma incubação em butanol a 60°C durante 12 h. Após a desidratação, os pés ambulacrários foram colocados 6h num banho de parafina a 60°C e de seguida, foram colocados em moldes com parafina a 60°C durante mais 12 h. Por fim, os moldes foram colocados a 4°C durante 2 h para que solidificassem. Foram efetuados cortes longitudinais dos pés ambulacrários de 7 µm com um micrótomo (Leica RM 2155). Para remover a parafina os pés foram incubados duas vezes em xileno durante 5 min, seguido de uma hidratação gradual dos pés ambulacrários. Primeiramente foram lavados três vezes durante 1 min em álcool a 90%, de seguida, foram lavados três vezes durante 1 min em álcool a 70%, e por fim foram lavados em água ultrapura durante 5 min. Para a coloração, incubaram-se as lâminas sempre à temperatura ambiente, primeiramente com hematoxilina férrica (Sigma), durante 5 min. Depois, foi removido o excesso da solução anterior com água destilada e as lâminas foram incubadas com *Biebrich scarlet* - Fucsina ácida (Sigma), durante 5 min. Foi removido o excesso da solução anterior com água destilada e incubaram-se as lâminas com uma solução de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, durante 5 min. De seguida, as lâminas foram incubadas com a solução de anilina azul (Sigma), durante 5 min, seguido de uma incubação de 2 min com ácido acético a 1% (Merck). Foi removido o excesso da solução anterior com água destilada e procedeu-se à desidratação gradual dos pés ambulacrários, com álcool a 70%, álcool a 90% e por fim xileno. A montagem final foi realizada com meio de montagem permanente (VectaMount, Vector).

2.8.2. Coloração azul Alcian

Para esta coloração, os pés ambulacrários foram processados como descrito no ponto 2.8.1. até à fase da hidratação gradual dos cortes histológicos. De seguida, as lâminas foram incubadas com ácido acético a 3%, durante 3 min, seguido de uma incubação com a solução azul *Alcian* pH 2.5 (Vector), durante 30 min. Findo este tempo foi removido o excesso da solução anterior com ácido acético a 3% durante cerca de 10 segundos. Realizou-se então uma lavagem em água corrente durante 2 min, seguida, de mais duas lavagens de 2 min em água destilada. Por fim, incubaram-se as lâminas com *Nuclear Fast Red Solution* (Vector), durante 5 min, e realizou-se as últimas lavagens em água corrente e em água destilada, antes de se proceder à desidratação e montagem dos pés ambulacrários como descrito em 2.8.1.

3. Resultados

A longo do presente projeto foram realizadas várias saídas de campo para recolha de ouriços do mar da espécie *P. lividus*, seguida da recolha de pés ambulacrários e extração de proteínas dos discos (parte adesiva) e de caules (parte não adesiva) com tampão RIPA e o auxílio de um moinho de esferas. Os extratos assim obtidos, foram quantificados pelo método de Bradford utilizando como proteína padrão BSA em 6 concentrações crescentes (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5 µg/ µl). Este ensaio foi realizado em triplicado para cada uma das concentrações da proteína padrão e das amostras de discos e caules. Após a medição da absorvância das amostras, foi possível construir uma reta de calibração que relaciona a média das absorvâncias para a proteína padrão com a sua concentração, sendo que o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi sempre ≥ 0.98 , o que permitiu validar os resultados obtidos. Através da equação da reta obtida em cada quantificação, foi possível inferir a concentração de proteínas presente nos extratos, variando entre 1.8 e 3.3 µg/µl para os discos e 0.61 e 1.8 µg/µl para os caules (Tabela 3.1). Estas oscilações devem-se ao facto de a quantidade de tecido em cada extrato ter sido variável.

Tabela 3.1 - Valores relativos à quantificação de proteínas (n=3) em extratos de discos e caules de pés ambulacrários do ouriço do mar *P. lividus*.

Data da extração	Concentração extratos dos discos (µg/µl)	Concentração dos extratos dos caules (µg/ µl)	R^2
19 Setembro	3.283	0.610	0,98
27 Dezembro	1.994	1.779	0,98
7 Fevereiro	1.926	1.367	0,98
25 Junho	2.64	0.876	0,99
7 Agosto	1.793	0.713	0,98

Também se procedeu à recolha de adesivo em placas de Petri de vidro, sendo posteriormente raspado e o pó resultante solubilizado com três tampões diferentes. A solubilização foi feita partindo sempre de aproximadamente 3 mg de adesivo, e o sucesso da solubilização foi avaliado das seguintes formas: 1) recolhendo adesivo em lâminas de microscópio, incubando com cada tampão e observando a presença/ausência de adesivo corado com violeta cristal; 2) pesando o adesivo antes e depois da solubilização; 3) quantificando as proteínas extraídas com cada tampão usando o método de Bradford.

Todos os tampões removeram com sucesso o adesivo das lâminas de microscópio (Figura 3.1). O tampão 2 foi, no entanto mais eficaz que o tampão 1 e 3 a solubilizar o adesivo, quer em termos de peso (solubilizou 64% do adesivo), quer em termos de quantidade de proteína obtida (0.4 µg/µl) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Peso e concentração do adesivo do ouriço do mar *P. lividus* solubilizado com os 3 tampões testados. Constituição dos tampões: Tampão 1 - Tris-HCl 63.2 mM, 2% SDS, 0.5 M DTT, pH 6.8; Tampão 2 - Tris-HCl 1.5 M, 7 M GndHCl, 20 mM EDTA, 0.5 M DTT 0.5, pH 8.5; Tampão 3 - 8M Ureia, 2% SDS, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, pH 4.3.

Tampão	Peso do adesivo antes da solubilização (mg)	Peso do adesivo após a solubilização (mg)	Quantidade de adesivo solubilizado (%)	Concentração do extrato de adesivo (µg/µl)
1	3.0	1.3	56.7	0.219
2	3.3	1.2	63.6	0.393
3	3.0	1.9	36.7	0.113

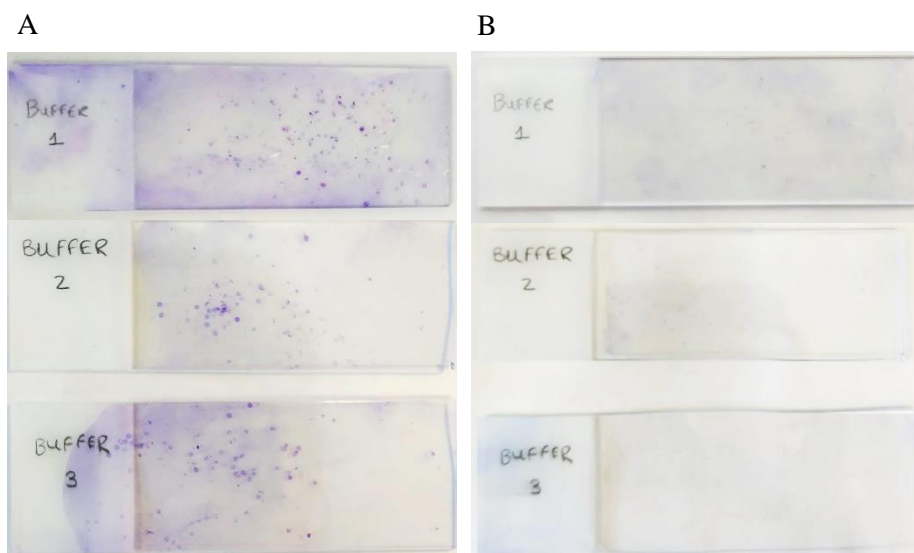


Figura 3.1 – Imagens do adesivo do ouriço do mar *P. lividus* recolhido em lâminas de microscópio, coradas com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal, antes (A) e depois (B) da solubilização com os 3 tampões testados. Tampão 1 - Tris-HCl 63.2 mM, 2% SDS, 0.5 M DTT, pH 6.8; Tampão 2 - Tris-HCl 1.5 M, 7 M GndHCl, 20 mM EDTA, 0.5 M DTT 0.5, pH 8.5; Tampão 3 - 8M Ureia, 2% SDS, 2% Triton X-100, 2% CHAPS, pH 4.3.

De forma a conhecer melhor a histologia dos órgãos adesivos do ouriço *P. lividus*, efetuaram-se também cortes longitudinais dos pés ambulacrários, subsequentemente corados com Tricrómio de Masson e Azul Alcian. Com a coloração com Tricrómio de Masson foi possível observar a vermelho o miomesotélio em torno do lúmen, a azul o tecido conjuntivo e os respetivos septos que se estendem por entre a epiderme do disco, e a castanho a epiderme. No disco a epiderme é mais espessa do que no caule, devido à presença de vários tipos de células que intervêm na adesão (células adesivas e “desadesivas”, intercaladas com células de suporte e células sensoriais). A epiderme adesiva é ainda suportada por esqueleto calcificado, sendo possível observar apenas os espaços ocupados por estes elementos uma vez que os pés ambulacrários foram descalcificados (Figura 3.2). Com coloração azul de Alcian é possível visualizar a presença de glícidos, ácidos sulfatados e carboxilados e sialomucinas sulfatadas e carboxiladas (glicoproteínas). A coloração obtida indica-nos uma predominância destas moléculas em toda a epiderme adesiva e na cutícula (Figura 3.3).

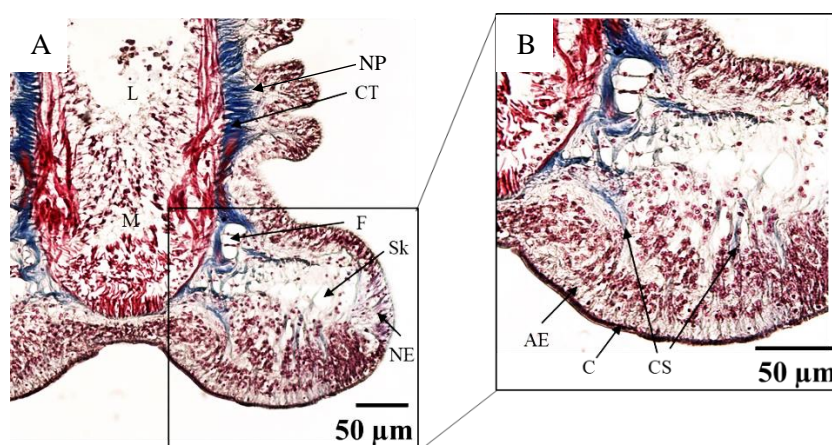


Figura 3.2 – Secção longitudinal de um pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus* corada com Tricrómio de Masson e observada por microscopia ótica com uma ampliação de 20× (A) e 40× (B). Legenda: AE – epiderme adesiva; C – cutícula; CS – septos de tecido; CT – tecido conjuntivo; F – moldura proximal; M – miomesotélio; NE – epiderme não adesiva; NP – plexo nervoso; Sk – esqueleto calcário.

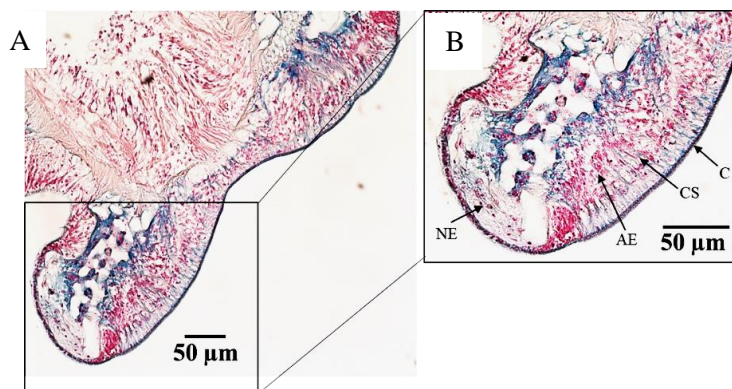


Figura 3.3 – Secção longitudinal de um pé ambulacrário do ouriço do mar *P. lividus* corada com azul de Alcian e observada por microscopia ótica com uma ampliação de 20× (A) e 40× (B). Legenda: AE – epiderme adesiva; C – cutícula; CS – septos de tecido conjuntivo; NE – epiderme não adesiva.

De seguida, foram utilizadas três metodologias, ELLA (*Enzyme Linked Lectin Assay*), *lectin blotting* e histoquímica com lectinas, para detetar os glúcidos presentes nos extratos dos pés ambulacrários (discos e caules) e no adesivo do ouriço do mar *P. lividus*.

A técnica ELLA foi utilizada com o objetivo de detetar de forma rápida os glúcidos (livres e conjugados) presentes em maior quantidade nos extratos dos discos do que nos caules. Seguidamente, a técnica de *lectin blotting* permitiu perceber que glúcidos se encontram conjugados com proteínas (i.e. glicoproteínas). Devido às dificuldades de solubilização e separação das proteínas dos extratos do adesivo esta técnica só foi aplicada com sucesso aos extratos dos discos e dos caules dos pés ambulacrários. Finalmente, a histoquímica com lectinas, permitiu localizar os glúcidos em cortes histológicos dos pés ambulacrários e no próprio adesivo.

Para facilitar a compreensão dos resultados obtidos, estes serão apresentados de acordo com o agrupamento das 22 lectinas usadas, em função dos glúcidos que detetam (Tabela 3.3).

A **forma simples de N-acetilglucosamina** é apenas detetada pela lectina **GSL II**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos dos discos incubados com a lectina GSL II é 2.6× superior à absorvância dos extratos do caule (Figura 3.4). Não houve qualquer inibição da lectina com quitina hidrolisada numa diluição de 1:4 (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2). No *lectin blotting* dos extratos dos pés ambulacrários não foi detetada qualquer glicoproteína pela GSL II. Já no *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos da presença de N-acetilglucosamina (Figura 3.5A-B). Por histoquímica foi também possível observar marcação intensa apenas no disco do pé ambulacrário, mais especificamente na zona da epiderme adesiva e muito ligeiramente na cutícula (Figura 3.5D). A mesma marcação intensa foi observada no adesivo secretado (Figura 3.5C).

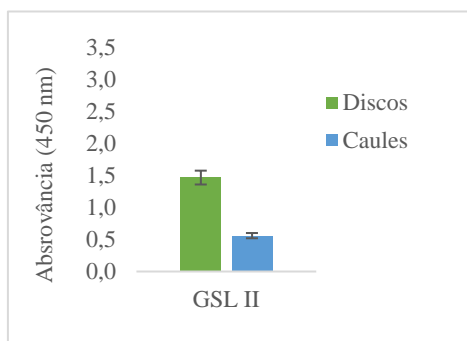


Figura 3.4 – Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com lectina GSL II (*Griffonia simplicifolia* lectin II) que deteta preferencialmente N-acetilglucosamina. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

Tabela 3.3 – Agrupamento das lectinas utilizadas, em função dos glícidos que detetam (baseado em Debray *et al.* 1986, EY Labs - <http://eylabs.com/> e Vector Laboratories - <https://www.vectorlabs.com/>).

Nome da lectina	Acrónimo	Glícido detetado	
<i>Griffonia</i> (Bandeiraea) <i>simplicifolia</i> lectin II	GSL II	N-acetilglucosamina	GlcNAc
Concavalina A	Con A	Manose/ D-glucose/ N-acetilglucosamina	[GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)] [GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)] Man(β1-4)] GlcNAc(α) > D- Man(α-) > D-Glc(α-) > GlcNAc(α-)
<i>Lens culinaris</i> agglutinin	LCA		[GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)] [GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)] [Man(β1-4)Man(α-)]
<i>Pisum sativum</i> agglutinin	PSA		[GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)] [GlcNAc(β1-2)Man(α1-3)] Man(β1-4)] GlcNAc(α) > D- Man(α-) > D-Glc(α-) > GlcNAc(α-)
<i>Phaseolus vulgaris</i> erythro agglutinin	PHA-E	Galactose/ N-acetilglucosamina/ Manose	Galβ4GlcNAcβ2Manα6; (GlcNAcβ4); (GlcNAcβ4Manα3); Manβ4
<i>Phaseolus vulgaris</i> leuco agglutinin	PHA-L		Galβ4GlcNAcβ6; (GlcNAcβ2Manα3); Manα3
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	DBA	N-acetilgalactosamina	Terminal α-GalNAc. α-linked GalNAc
<i>Vicia villosa</i> agglutinin	VVA		α- or β-linked terminal GalNAc
<i>Erythrina cristagalli</i> lectin	ECL	N-acetillactosamina/ N-acetilgalactosamina	LacNAc > La > GalNAc > Gal.
<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (isolada a partir da EBL)	SNA/EBL	Ácido siálico/ Galactose/ N-acetilgalactosamina	Neu5Ac (α-2,6) linkage
<i>Maackia amurensis</i> lectin II	MAL II		Neu5Ac (α-2,3) linkage
<i>Wheat germ</i> agglutinin	WGA	Quitobiose/ N-acetilglucosamina/ N-acetilgalactosamina	[GlcNAcβ(1,4)] ₂ GlcNAc > GlcNAcβ(1,4) GlcNAc > GlcNAc > Neu5Ac) > GalNAc
<i>Succinylated wheat germ</i> <i>agglutinin</i>	sWGA		[GlcNAcβ(1,4)] ₂ GlcNAc > GlcNAcβ(1,4) GlcNAc > GlcNAc > GalNAc
<i>Solanum tuberosum</i> (potatoe) <i>lectin</i>	STL		[GlcNAcβ(1,4)] ₃ GlcNAc > [GlcNAcβ(1,4)] ₂ GlcNAc > GlcNAcβ(1,4) GlcNAc
<i>Datura stramonium</i> lectin	DSL		Quitotriose > Quitotriose > GlcNAc
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato) <i>lectin</i>	LEL		Lectinas de ligação à quitina. GlcNAc β(1,4) GlcNAc oligómeros até 4 unidades de glícidos
<i>Jacalin</i>	Jacalin	Galactose/ N-acetilgalactosamina	Galactose α-D-Galactose e oligossacarídeos que terminam com este açúcar. Liga-se apenas a oligossacarídeos ligados glicosidicamente, preferindo a estrutura Gal (β- 1,3) GalNAc.
<i>Peanut agglutinin</i>	PNA		Lac > β-Gal.
<i>Soybean agglutinin</i>	SBA		Terminal α- e β- GalNAc
<i>Griffonia</i> (Bandeiraea) <i>simplicifolia</i> lectin I	GSL I		α-Gal oligossacarídeos, α- GalNAc-O-Ser/Thr. A-Gal, α- GalNAc.
<i>Ricinus communis</i> agglutinin I	RCA I/RCA ₁₂₀		β-Gal, com preferência por açúcares terminais.
<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I	UEA I	Fucose	α-Fuc

Gal - Galactose, GalNAc - N-acetilgalactosamina, Glc - Glucose, GlcNAc - N-acetilglucosamina, Man - Manose, NeuAc - ácido siálico, Ser - serina, Thr - treonina

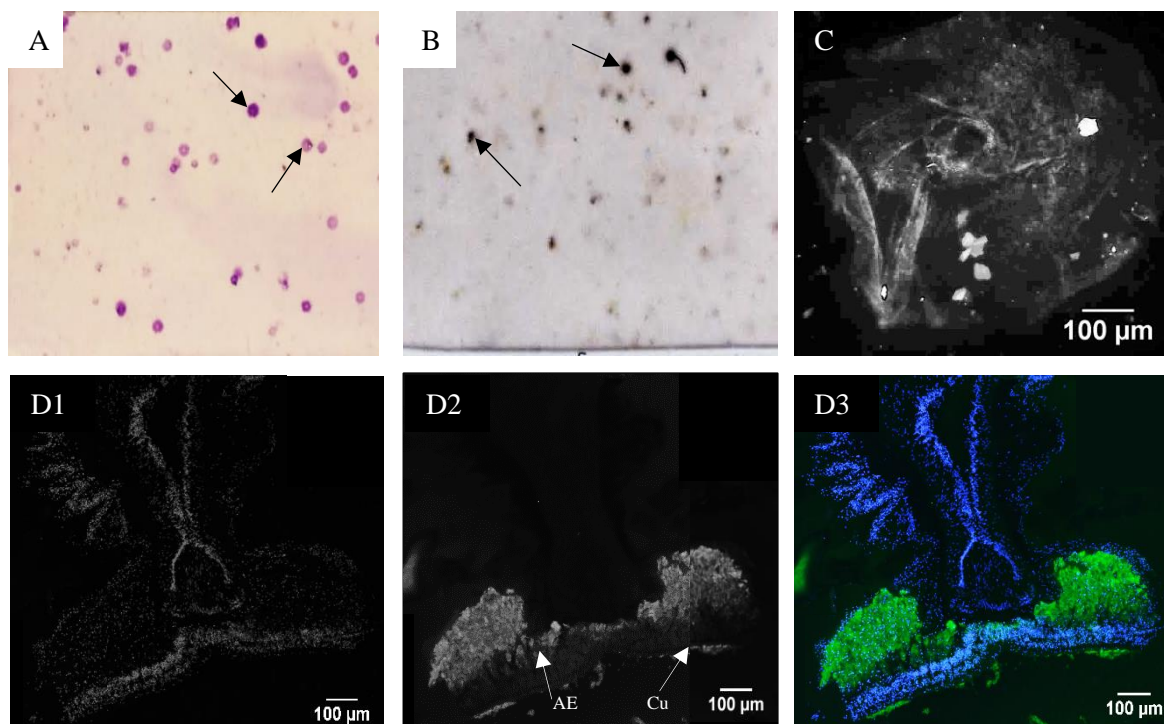


Figura 3.5 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C-D) usando a lectina GSL II (*Griffonia simplicifolia* lectin II). **A** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **B** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 5 min). **C** – Adesivo marcado após incubação com a lectina. **D** – Histoquímica do pé ambulacrário. **D1** – Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **D2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **D3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE – epiderme adesiva, Cu – cutícula.

A **ConA**, **LCA** e **PSA** fazem parte do grupo de lectinas que detetam preferencialmente **N-acetilglucosamina ligada a Manoses**, e **secundariamente só Manose, Glucose ou N-acetilglucosamina**. Para este grupo de lectinas, verificou-se que no ensaio ELLA a absorvância dos extratos de discos e caules incubados com lectina ConA é idêntica, sendo esta inibida com sucesso com 0.4 M de α -Methylmannoside. A absorvância dos extratos de discos incubados com as lectinas LCA e PSA é 1.5× superior do que a absorvância dos extratos do caule, não havendo qualquer inibição destas lectinas com 0.2 M de α -methylglucoside (Figura 3.6) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

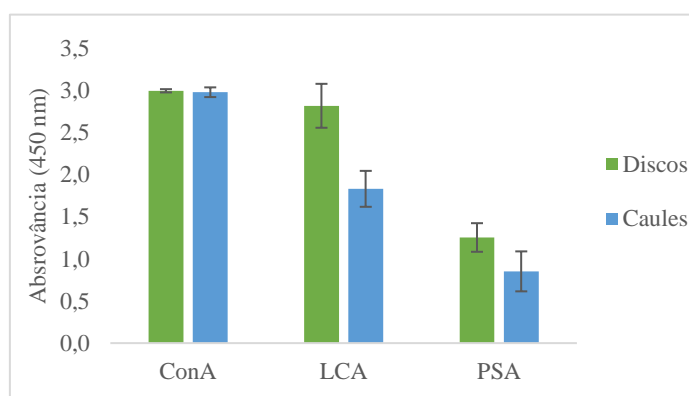


Figura 3.6 – Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas ConA (Concavalina A), LCA (*Lens culinaris* agglutinin) e PSA (*Pisum sativum* agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilglucosamina ligada a Manose ou Glucose. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

A lectina **ConA** detetou no *lectin blotting* várias glicoproteínas quer nos extratos dos discos como nos caules (Figura 3.7A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos da presença de N-acetilglucosamina ligada a Manoses ou só Manose, Glucose ou N-acetilglucosamina (Figura 3.7C-D). Em concordância, por histoquímica foi possível observar marcação intensa no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.7F), bem como no adesivo secretado (Figura 3.7E).

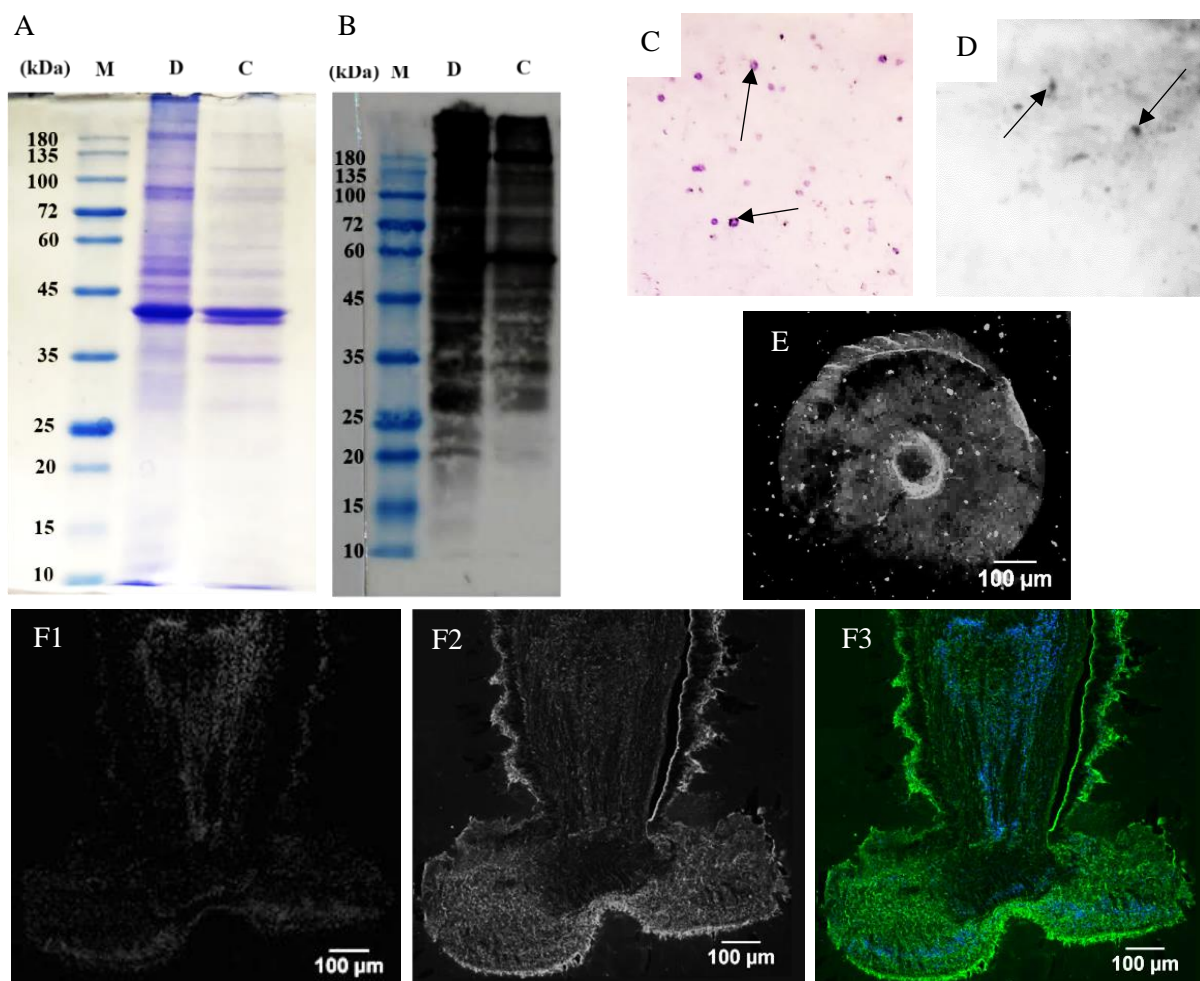


Figura 3.7 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina ConA (*Concavalina A*). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 0.9 seg). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 5 seg). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

A lectina **LCA** detetou no *lectin blotting* duas bandas com massas moleculares de 72 e 135 kDa, mais intensas nos extratos dos discos em comparação com os caules (Figura 3.8A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos da presença de N-acetilglucosamina ligada a Manoses ou só Manose (Figura 3.8D). Por histoquímica foi possível observar também marcação intensa no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.8F1-F3) e no adesivo secretado (Figura 3.8E).

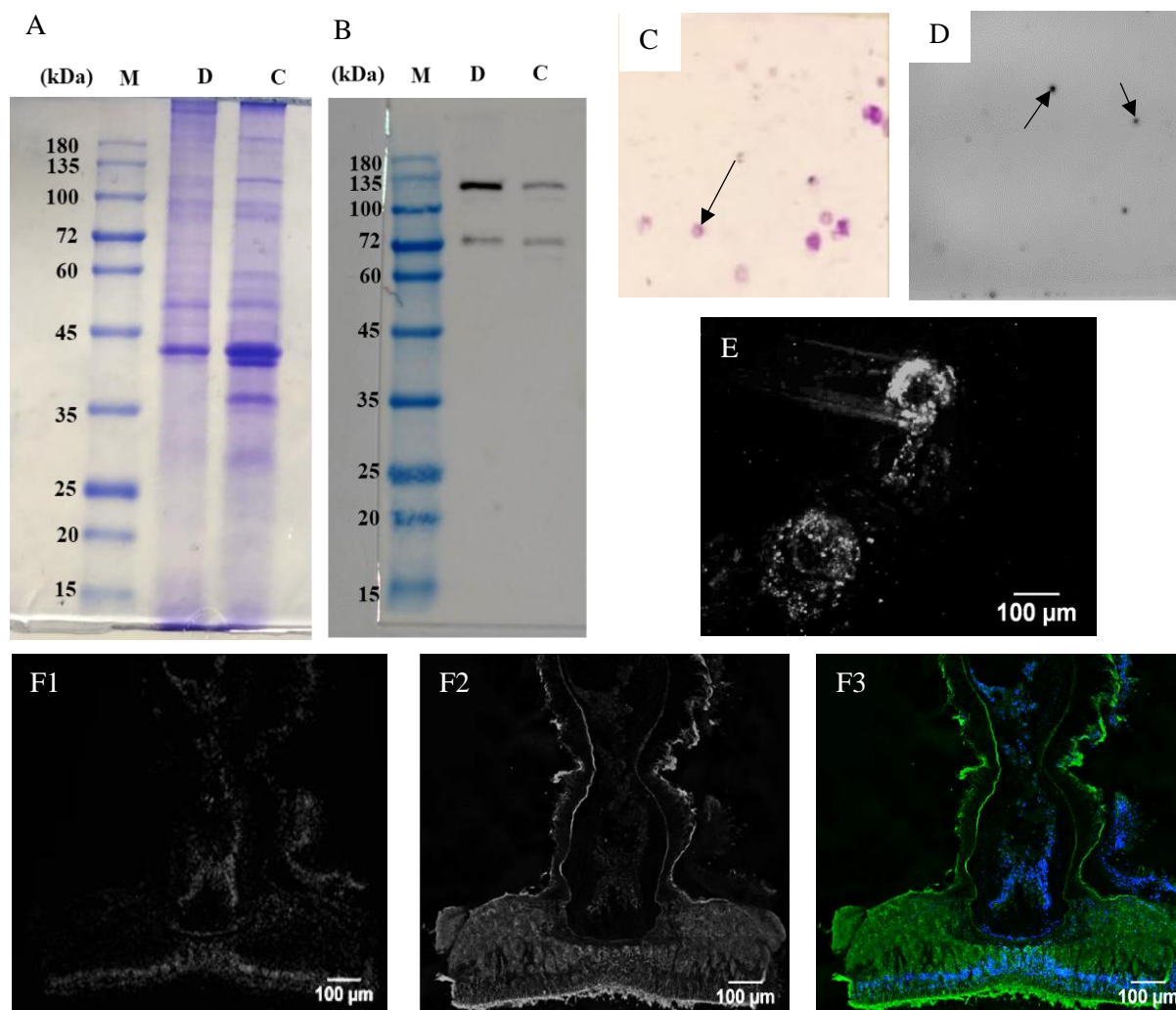


Figura 3.8 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina LCA (*Lens culinaris* agglutinin). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 3 min). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 5 min). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

A lectina **PSA** detetou também no *lectin blotting* duas bandas com massas moleculares de 72 e 135 kDa, mais intensas nos extratos dos discos, do que nos caules (Figura 3.9A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar também pequenos círculos a preto indicando a presença de N-acetilglucosamina ligada a Manoses ou só Manose, Glucose ou N-acetilglucosamina no adesivo secretado (Figura 3.9C-D). Em convergência com o *lectin blotting*, por histoquímica também foi possível observar marcação intensa no adesivo secretado (Figura 3.9E), bem como no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.9F).

As lectinas **PHA-E** e **PHA-L** fazem parte do grupo de lectinas que detetam **N-acetilglucosamina ligada a Galactose e Manose, ou só N-acetilglucosamina ou Manose**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos de discos e caules incubados com a lectina PHA-E é idêntica. Já a absorvância dos extratos de discos incubados com a lectina PHA-L é 1.6× superior à absorvância dos extratos dos caules. Ambas as lectinas foram parcialmente inibidas com 100 mM de ácido acético (Figura 3.10) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

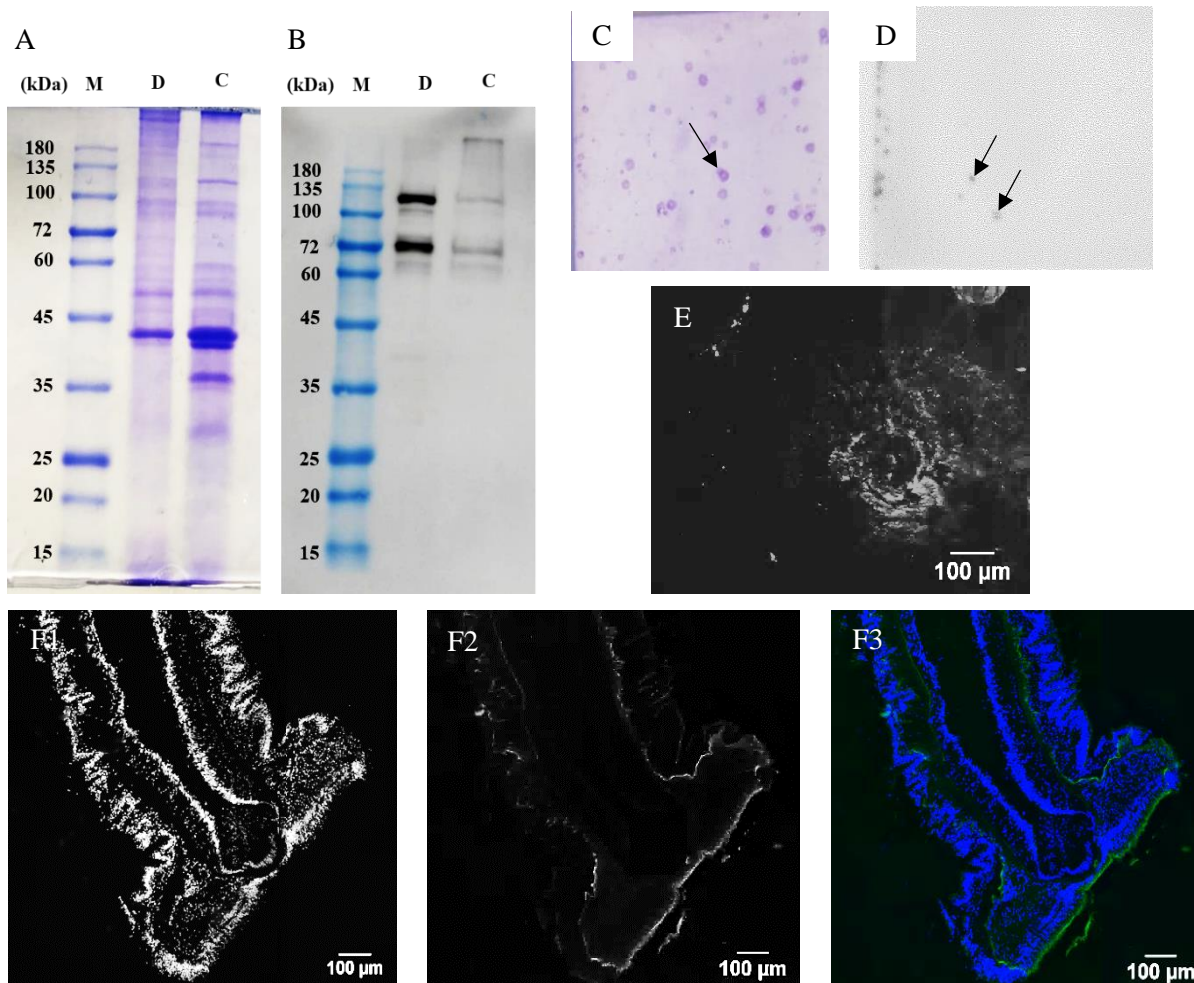


Figura 3.9 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina PSA (*Pisum sativum* agglutinin). A- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. B – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 2 min). C – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). D – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 12 min). E - Adesivo marcado após incubação com a lectina. F– Histoquímica do pé ambulacrário. F1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). F2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). F3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

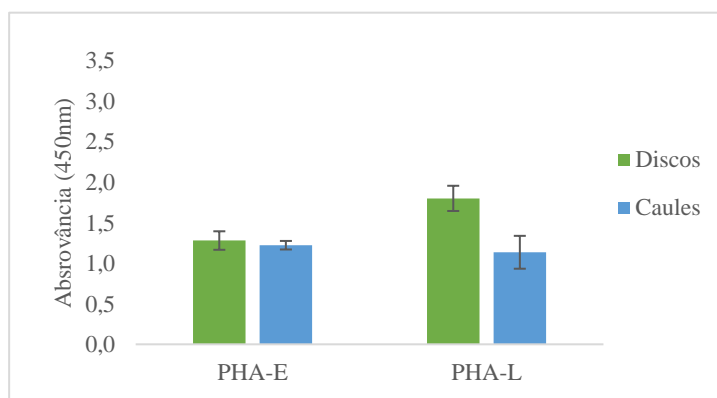


Figura 3.10 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas PHA-E (*Phaseolus vulgaris* erythro agglutinin) e PHA-L (*Phaseolus vulgaris* leuco agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilglucosamina ligada a Galactose e Manose, ou só N-acetilglucosamina ou Manose. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

A lectina **PHA-E** detetou no *lectin blotting* do adesivo pequenos círculos a preto revelando a presença de N-acetilglucosamina ligada a Galactose e Manose, ou só N-acetilglucosamina ou Manose no adesivo (Figura 3.11A-B). Em conformidade, também por histoquímica foi possível detetar marcação com esta lectina, mais intensa no adesivo (Figura 3.11C), do que no disco e no caule (Figura 3.11D). No entanto, no *lectin blotting* dos pés ambulacrários não foram detetadas quaisquer glicoproteínas.

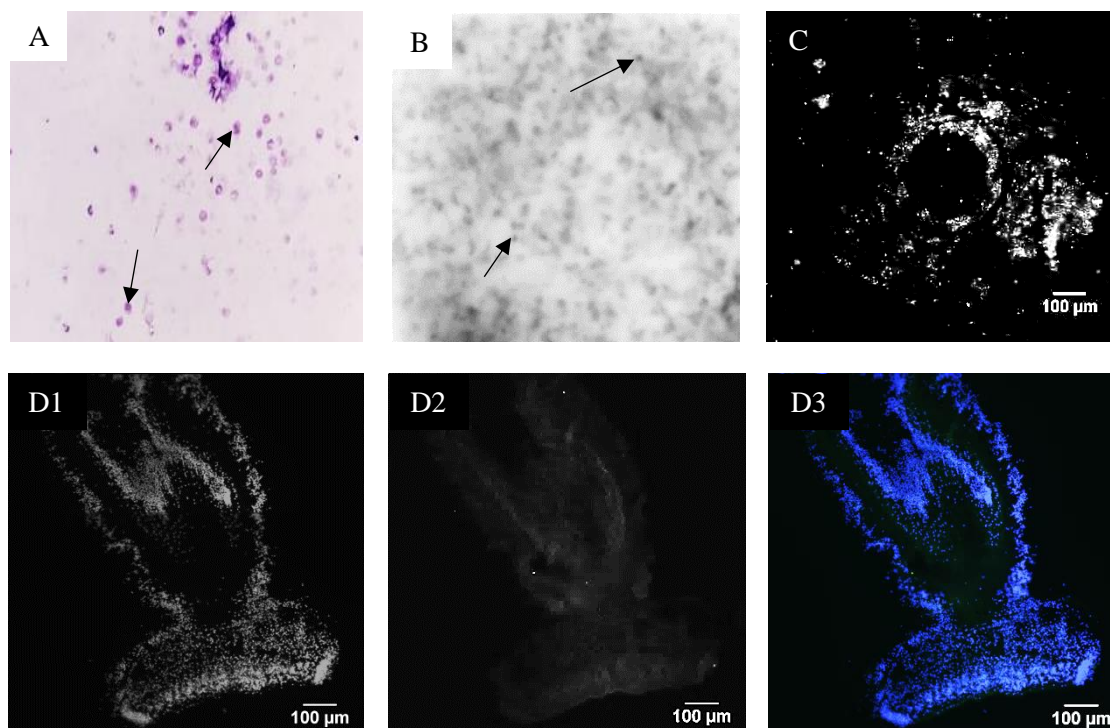


Figura 3.11 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C-D) usando a lectina PHA-E (*Phaseolus vulgaris erythro agglutinin*). **A** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **B** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 2.2 seg). **C** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **D** – Histoquímica do pé ambulacrário. **D1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **D2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **D3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

No *lectin blotting* dos pés ambulacrários a lectina **PHA-L** detetou várias glicoproteínas nos extratos dos discos e dos caules, e com igual intensidade (Figura 3.12A-B). No *lectin blotting* e histoquímica do adesivo foi possível detetar e visualizar a presença de adesivo secretado (Figura 3.12C-D e 3.12E-F). Na histoquímica do pé ambulacrário observou-se marcação igualmente intensa no disco e no caule (Figura 3.12G).

A forma simples de **N-acetilgalactosamina** é detetada pela lectinas **DBA** e **VVA**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos dos discos incubados com a lectina DBA é 1.3× superior à absorvância dos extratos do caule, enquanto que com a lectina VVA é 2× superior. A lectina DBA foi parcialmente inibida com 0.4 M de N-acetilgalactosamina, enquanto que a inibição da lectina VVA não foi testada (Figura 3.13) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

A lectina **DBA** detetou no *lectin blotting* várias bandas nos extratos dos discos e dos caules, sendo que detetou nos discos duas bandas mais intensas com massas moleculares de 72 e 135 kDa (Figura 3.14A-B). À semelhança do *lectin blotting*, por histoquímica também foi possível observar alguma marcação pouco intensa quer no disco, quer no caule do pé ambulacrário (Figura 3.14C). Com esta lectina não foi possível detetar o adesivo, nem por *lectin blotting*, nem por histoquímica.

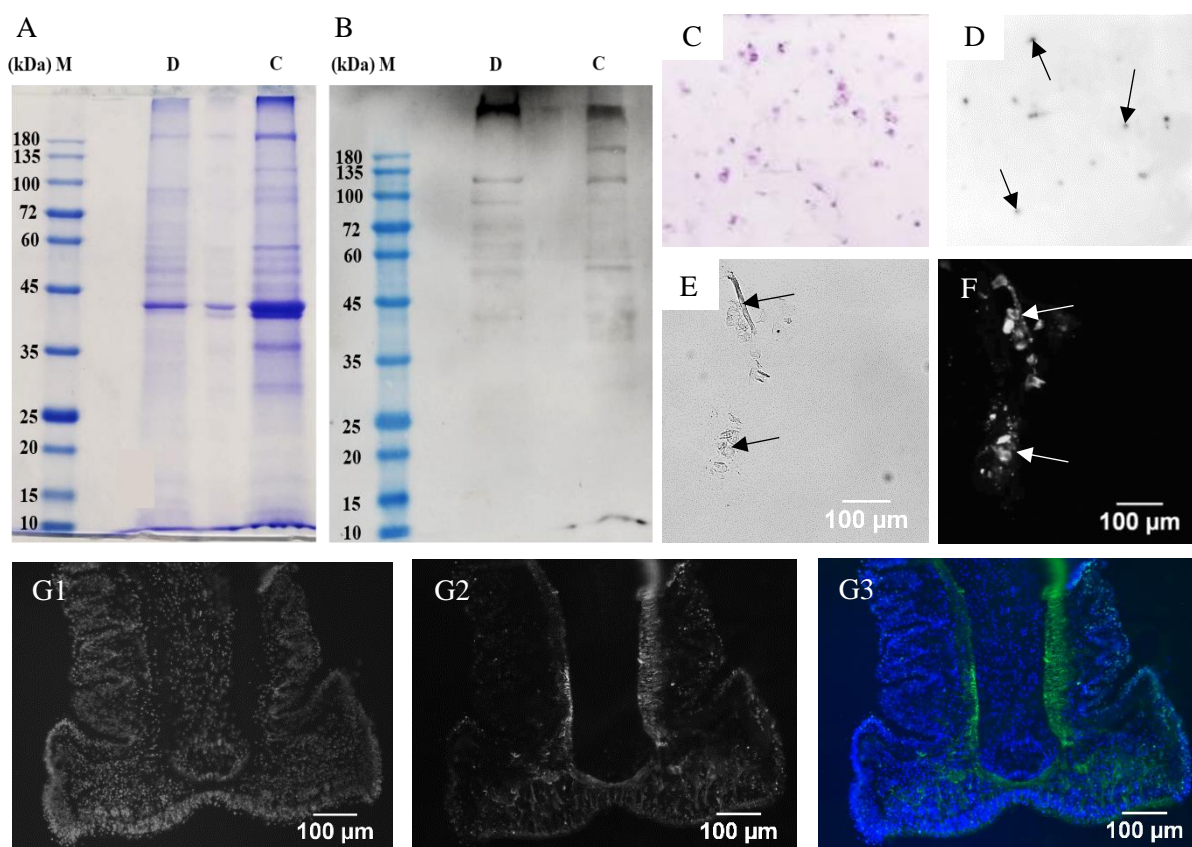


Figura 3.12 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-G) usando a lectina PHA-L (*Phaseolus vulgaris leuco* agglutinin). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 10 min). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 10 min). **E** - Imagem de microscopia do *brightfield*, comprovado a existência de um filme de adesivo. **F** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **G**– Histoquímica do pé ambulacrário. **G1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **G2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **G3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

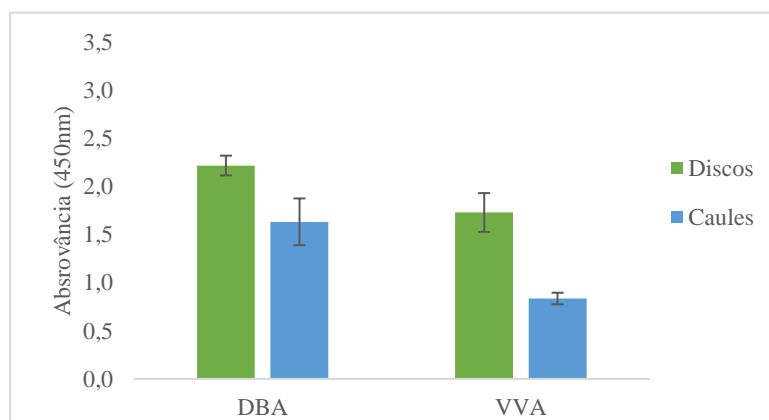


Figura 3.13 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) e VVA (*Vicia villosa* agglutinin) que detetam preferencialmente N-acetilgalactosamina. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

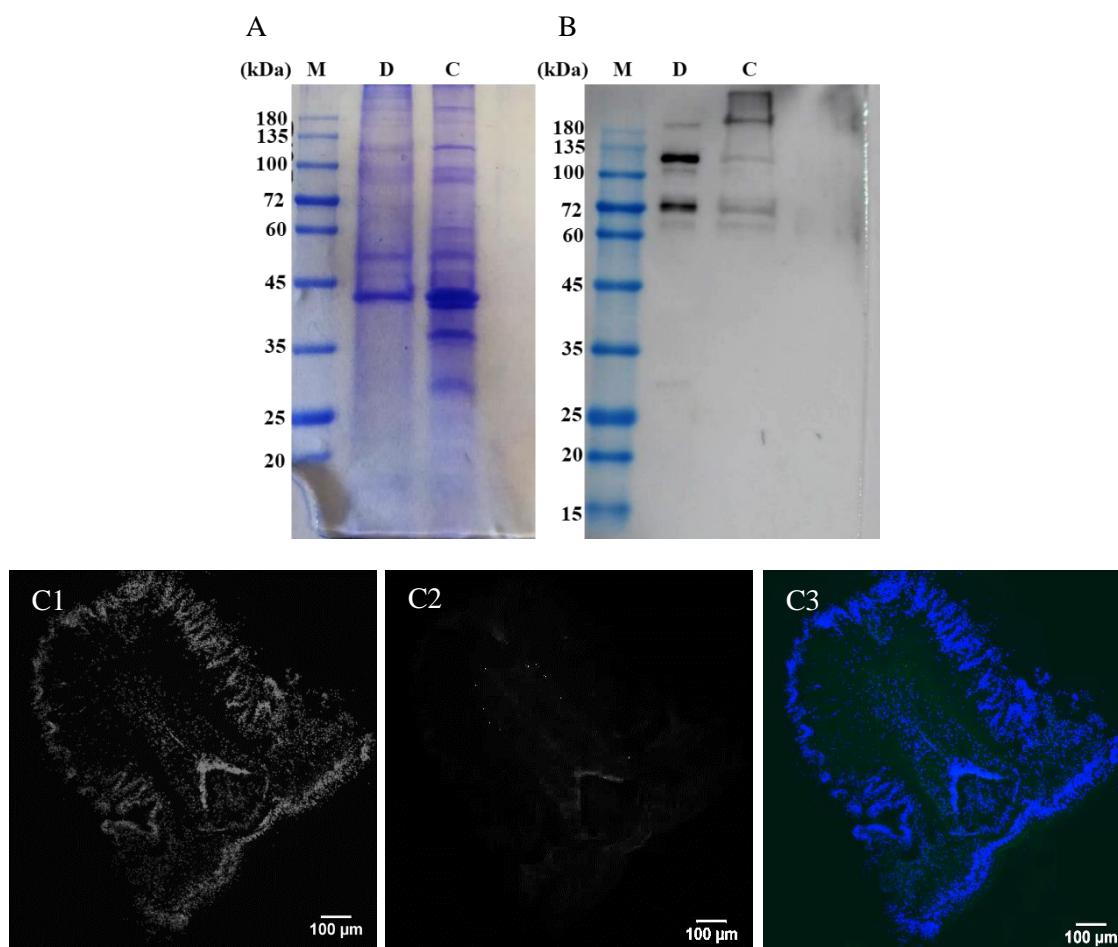


Figura 3.14 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C) usando a lectina DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin). A- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. B – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 3 min). C – Histoquímica do pé ambulacrário. C1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). C2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). C3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

Na histoquímica do pé ambulacrário da lectina VVA foi possível observar marcação intensa apenas no disco do pé ambulacrário, mais especificamente na zona da epiderme adesiva e na cutícula (Figura 3.15A). Não foi detetada qualquer glicoproteína no *lectin blotting* dos pés ambulacrários. No *lectin blotting* e na histoquímica do adesivo secretado, não foi detetado nem visualizado qualquer resultado.

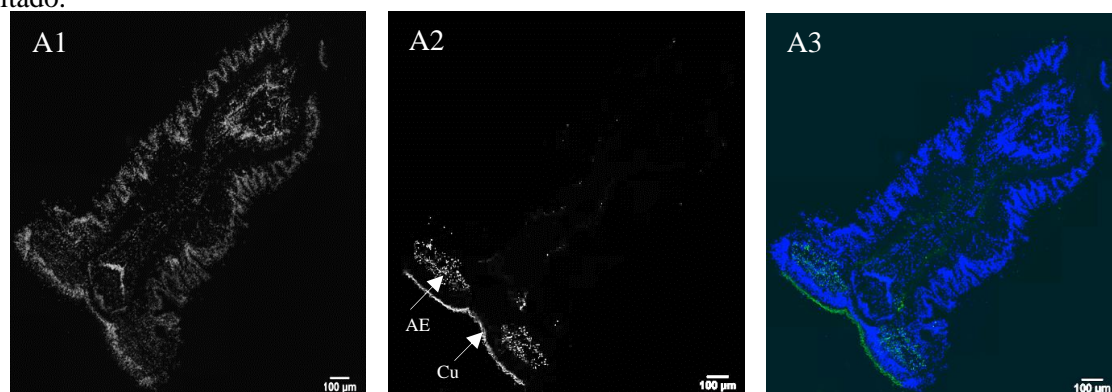


Figura 3.15 – Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina VVA (*Vicia villosa* agglutinin). A1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). A2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). A3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE – Epiderme adesiva; Cu – cutícula.

A lectina **ECL** deteta **N-acetilactosamina, lactose, N-acetilgalactosamina e Galactose**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos dos discos incubados com a lectina ECL foi 1.6× superior à absorvância dos extratos do caule (Figura 3.16). Não houve qualquer inibição da lectina com 0.4 M de lactose (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2). No *lectin blotting* dos extratos dos pés ambulacrários não foi identificada qualquer glicoproteína detetada pela ECL. Contudo, no *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos da presença dos glícidos acima referidos (Figura 3.17A-B). Por histoquímica foi possível observar marcação, mas pouco intensa quer no disco, quer no caule do pé ambulacrário. (Figura 3.17E), assim como no adesivo secretado (Figura 3.17D).

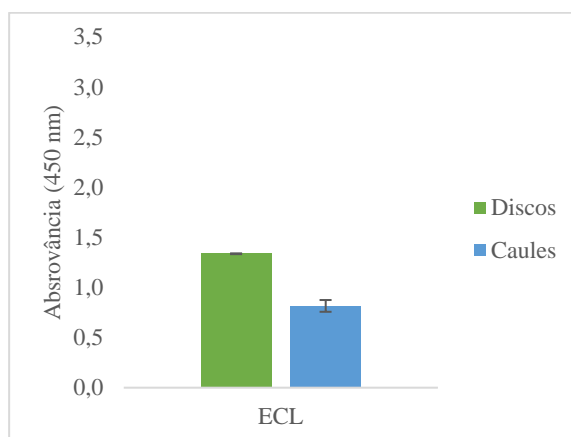


Figura 3.16 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com lectina ECL (*Erythrina cristagalli* lectin) que deteta preferencialmente N-acetilactosamina, lactose, N-acetilgalactosamina e Galactose. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

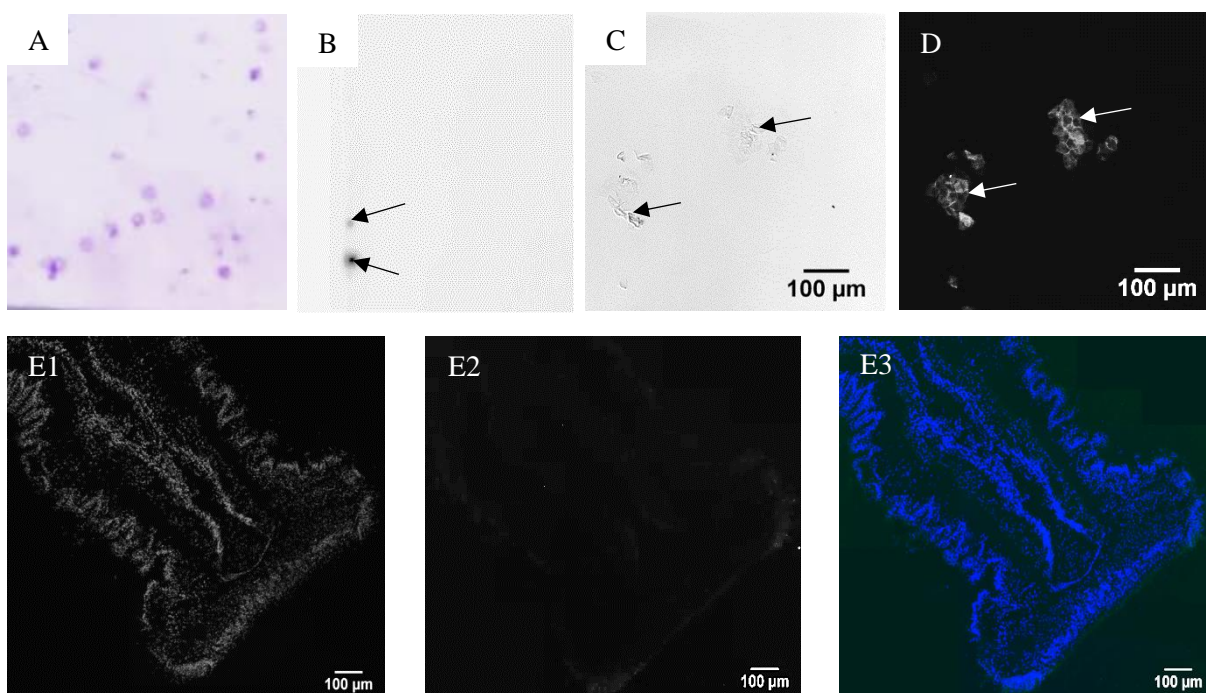


Figura 3.17 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C-E) usando a lectina ECL (*Erythrina cristagalli* lectin). **A** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **B** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 2 min). **C** - Imagem de microscopia do *brightfield*, comprovado a existência de um filme de adesivo. **D** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **E**– Histoquímica do pé ambulacrário. **E1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **E2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **E3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

As lectinas **SNA/EBL** e **MAL II** fazem parte do grupo de lectinas que deteta **ácido siálico ligado a Galactose e N-acetilgalactosamina**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos de discos incubados com a lectina SNA/EBL é 2.2× superior à absorvância dos extratos do caule, enquanto que com a lectina MAL II é de 1.6×. Ambas as lectinas foram inibidas com sucesso com 0.4 M de ácido siálico (Figura 3.18) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

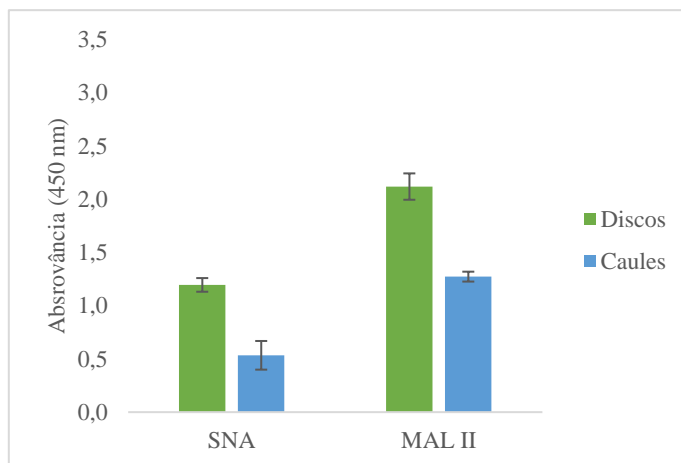


Figura 3.18 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas SNA/EBL (*Sambucus nigra* - Elderberry agglutinin) e MAL II (*Maackia amurensis* lectin II) que detetam preferencialmente ácido siálico ligado a Galactose e N-acetilgalactosamina. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

A lectina **SNA/EBL** detetou no *lectin blotting* duas bandas com massas moleculares de 72 e 135 kDa, exclusivamente nos extratos dos discos (Figura 3.19A-B). Por histoquímica foi possível observar apenas uma marcação muito ténue no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.19C). Com esta lectina não foi possível detetar nem por *lectin blotting*, nem por histoquímica, qualquer marcação no adesivo secretado.

Com a lectina **MAL II** não foi detetada qualquer glicoproteína no *lectin blotting* dos pés ambulacrários, mas por histoquímica foi possível observar marcação intensa do disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.20A). Já para o adesivo secretado, não houve qualquer resultado com ambas as técnicas.

O grupo de lectinas composto pela **WGA, sWGA, STL, DSL e LEL** detetam **quitobiose, N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina**. No ensaio ELLA obtiveram-se valores muito idênticos de absorvância dos extratos de discos e caules incubados com as lectinas sWGA, STL e LEL. Já com DSL a absorvância dos extratos de discos foi 1.8× superior à absorvância dos extratos dos caules, e com WGA a diferença foi ainda maior, cerca de 3× superior. Em termos de inibição, a lectina WGA foi inibida com sucesso com 0.2 M N-acetilglucosamina, as lectinas STL e LEL foram apenas parcialmente inibidas com quitina hidrolisada numa diluição de 1:4, e por fim não se conseguiu nenhuma inibição para as lectinas sWGA e DSL com quitina hidrolisada numa diluição de 1:4 e 1:15 respetivamente (Figura 3.21) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

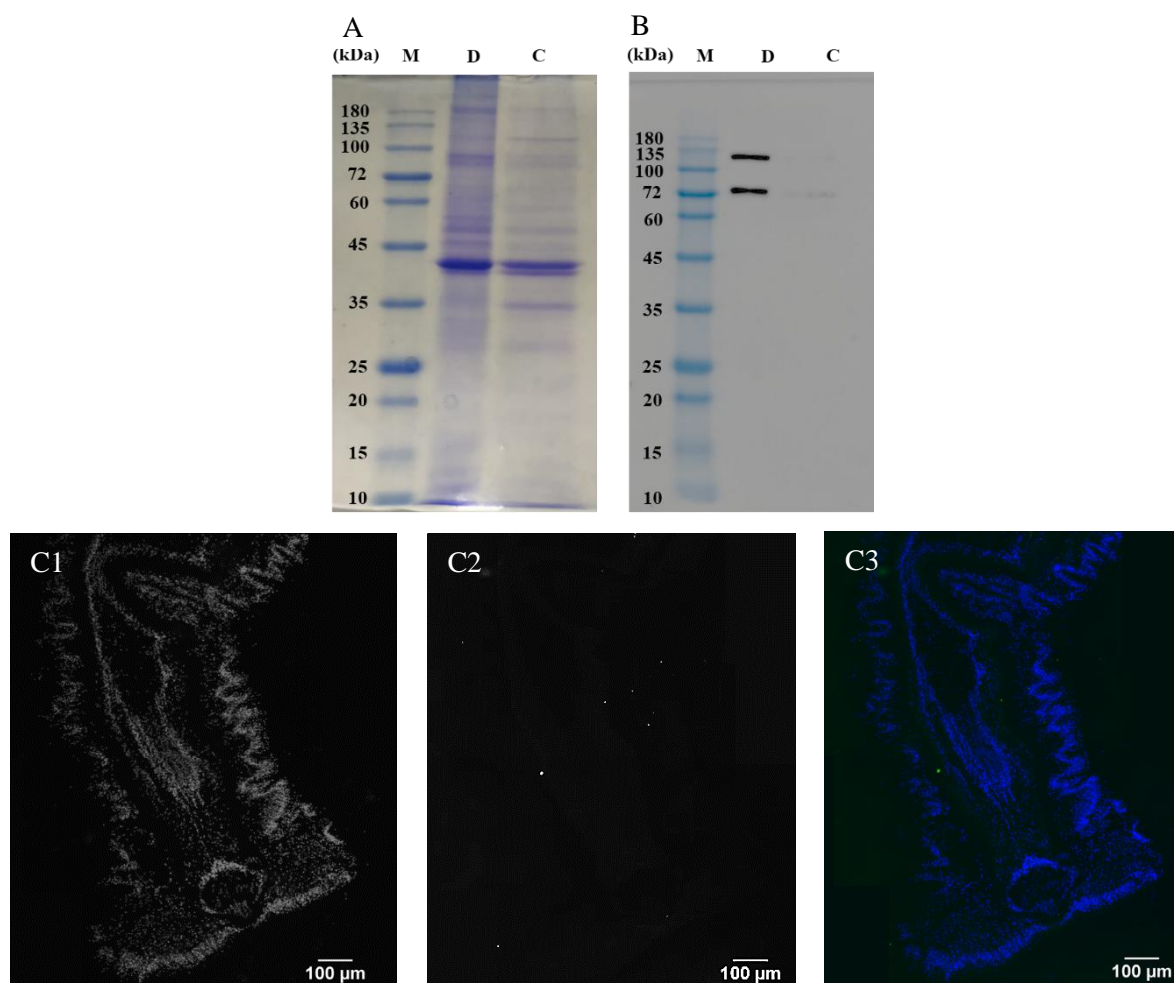


Figura 3.19 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C) usando a lectina SNA/EBL (*Sambucus nigra* - Elderberry agglutinin). A- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. B – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 1 min). C– Histoquímica do pé ambulacrário. C1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). C2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). C3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

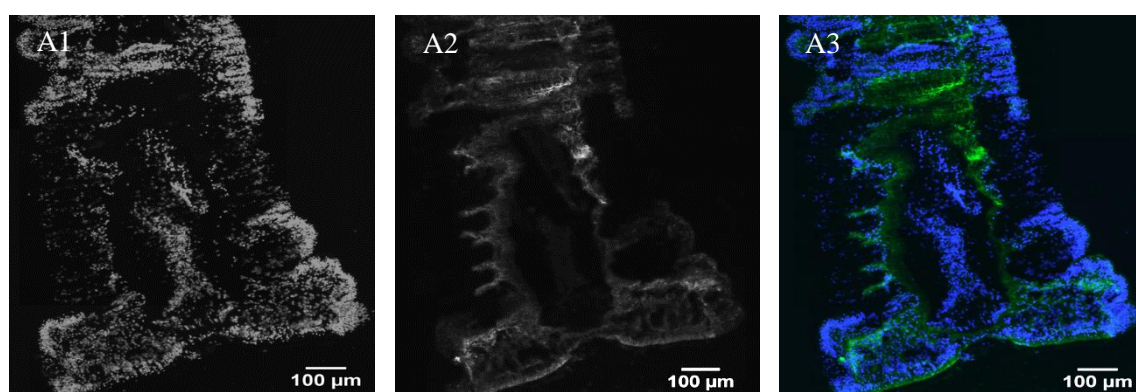


Figura 3.20 – Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina MALII (*Maackia amurensis lectin II*). A1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). A2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). A3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

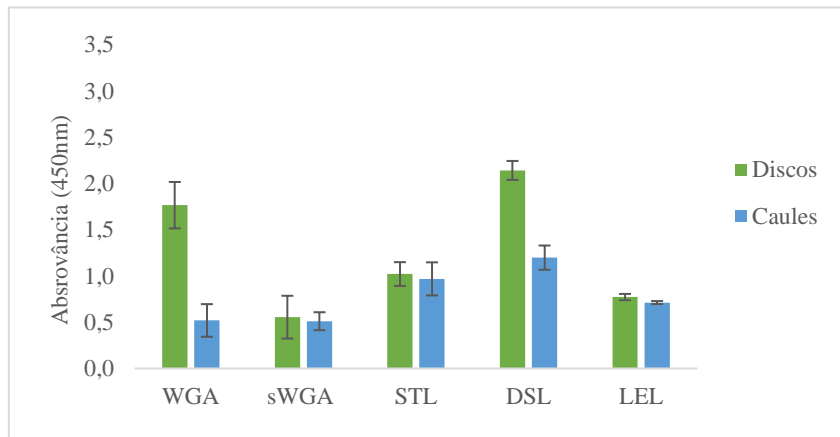


Figura 3.21 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas WGA (Wheat germ agglutinin), sWGA (Succinylated wheat germ agglutinin), STL (*Solanum tuberosum* lectin), DSL (*Datura stramonium* lectin) e LEL (*Lycopersicon esculentum* lectin) que detetam preferencialmente quitobiase, N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

Com a lectina **sWGA** não foi detetada qualquer glicoproteína no *lectin blotting* dos pés ambulacrários mas por histoquímica foi possível observar alguma marcação no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.22A). Já para o adesivo secretado não foi possível detetar qualquer marcação em nenhuma das técnicas.

Com a lectina **WGA** foi possível detetar duas glicoproteínas com massas moleculares de 72 e 135 kDa que estão presentes somente nos extratos dos discos (Figura 3.23A-B). Nas membranas contendo adesivo secretado foi possível visualizar marcação (Figura 3.23C-D). Por histoquímica foi possível observar marcação intensa no adesivo secretado (Figura 3.23E) e no disco do pé ambulacrário, mais especificamente na zona da epiderme adesiva e na cutícula (Figura 3.23F).

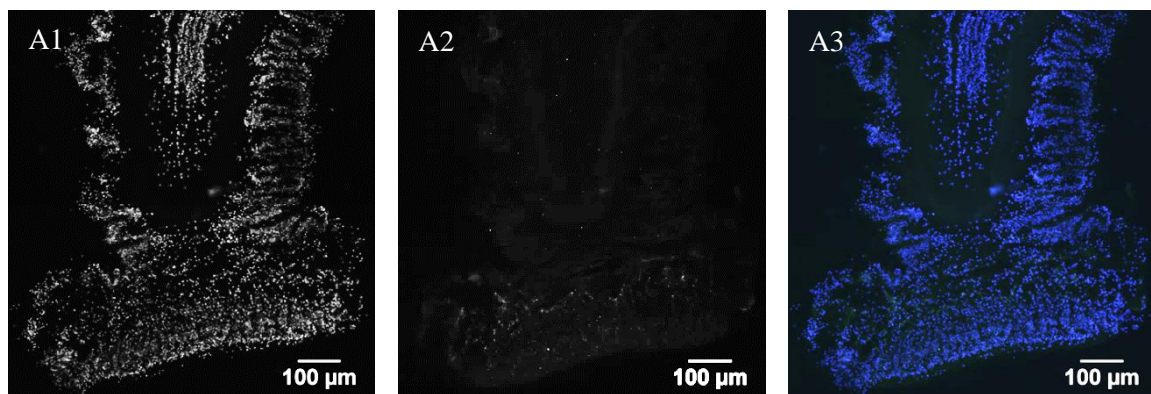


Figura 3.22 – Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina sWGA (Succinylated wheat germ agglutinin). **A1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **A2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **A3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

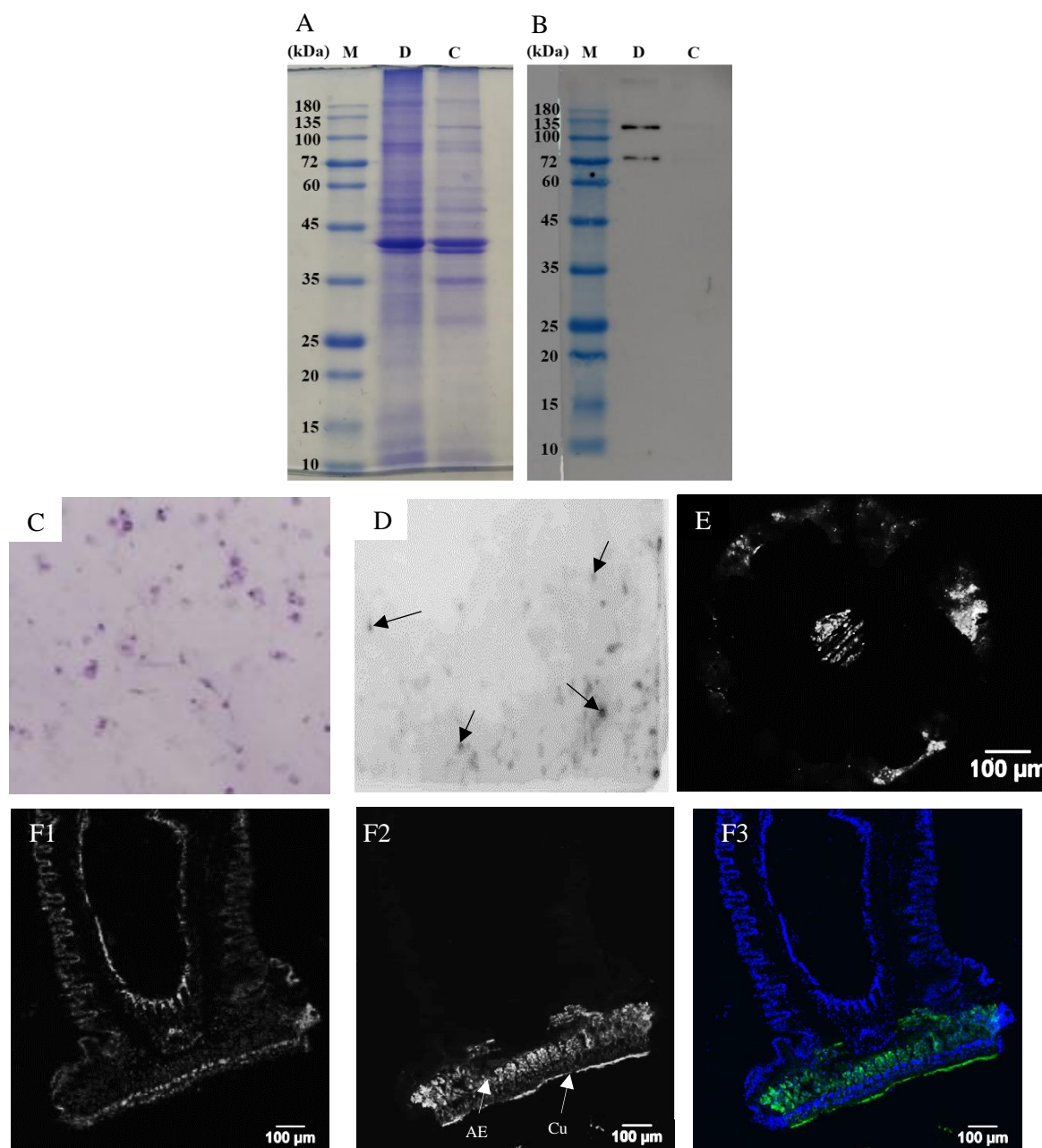


Figura 3.23 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 9 min). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 10 min). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE- epiderme adesiva; C – Caule; Cu – cutícula; D – disco; M - Marcadores.

A lectina **STL** detetou várias bandas no *lectin blotting* dos extratos dos discos e dos caules, destacando-se no entanto, uma banda mais intensa com massa molecular superior a 180 kDa presente apenas extratos dos discos (Figura 3.24A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos de deteção com esta lectina (Figura 3.24C-D). Por histoquímica foi possível observar marcação intensa no adesivo secretado, bem como no disco, mais precisamente na zona da epiderme adesiva e na cutícula. No caule observou-se apenas uma marcação muito ligeira (Figura 3.24E-F).

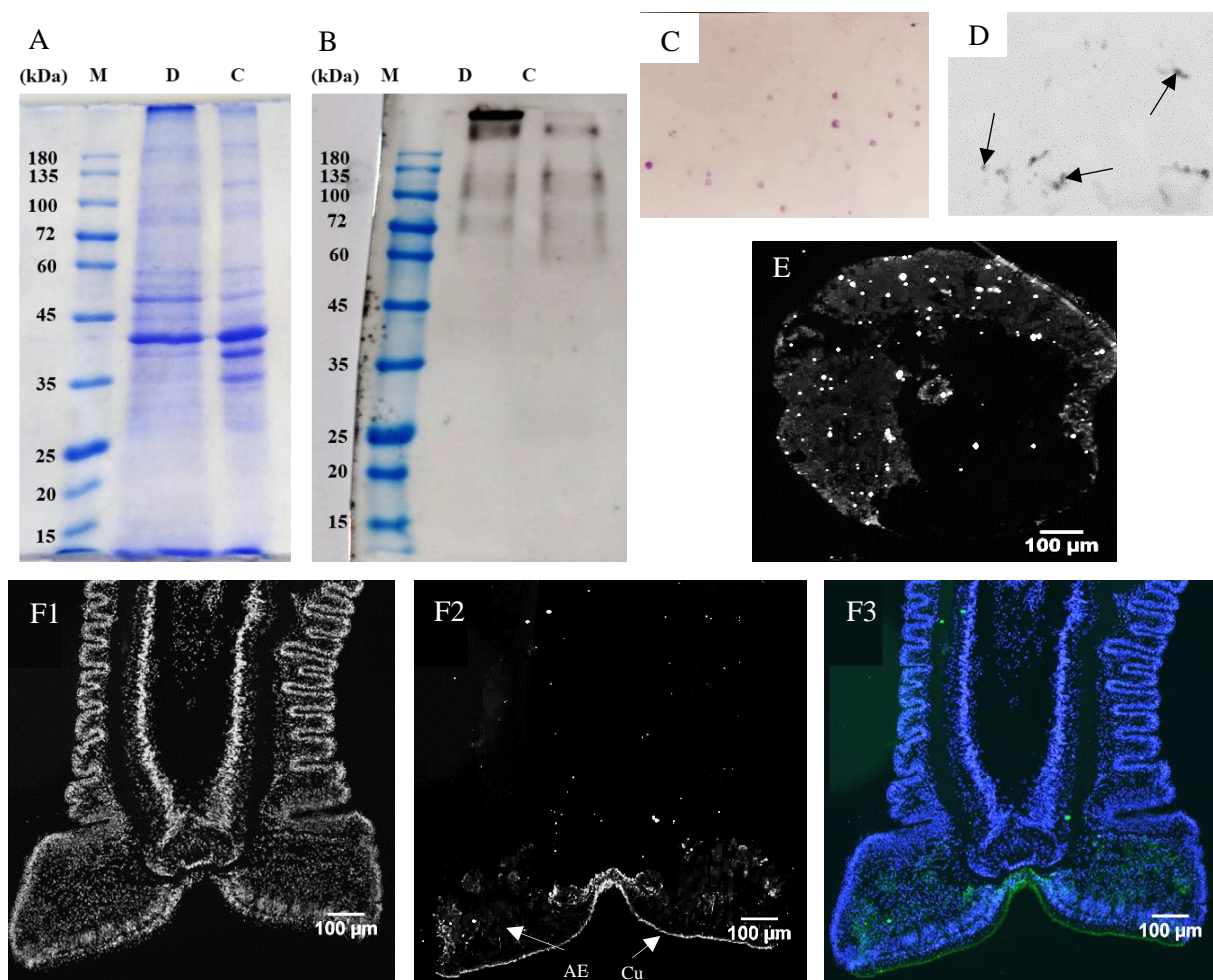


Figura 3.24 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina STL (*Solanum tuberosum* lectin). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 6 min). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 2 min). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE- epiderme adesiva; C – Caule; Cu - cutícula; D – disco; M - Marcadores.

A lectina **DSL** detetou no *lectin blotting* várias glicoproteínas quer nos extratos dos discos como nos caules (Figura 3.25A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar também pequenos círculos a preto indicativos de detecção com esta lectina (Figura 3.25C-D). Em concordância, por histoquímica foi possível observar marcação intensa no adesivo secretado (Figura 3.25E), bem como no disco e no caule. (Figura 3.25F).

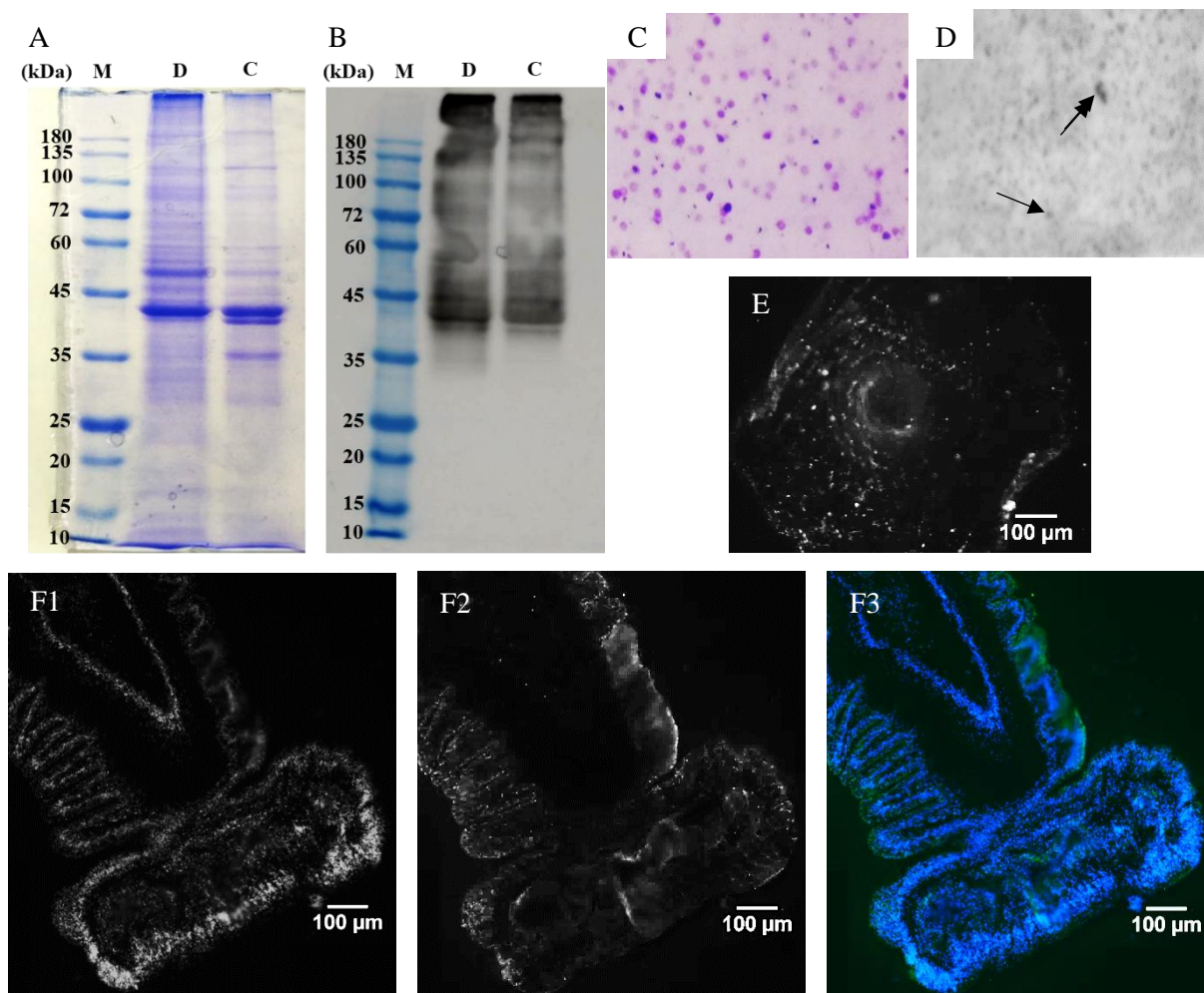


Figura 3.25 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (**A-D**) e histoquímica (**E-F**) usando a lectina DSL (*Datura stramonium* lectin). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 40 seg). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 45 seg). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

Com a lectina **LEL**, detetou-se no *lectin blotting* dos pés ambulacrários, uma banda com massa molecular superior a 180 kDa muito intensa nos extratos dos discos e muito ténue nos extratos dos caules (Figura 3.26A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar também marcação positiva com esta lectina indicada pelos pequenos círculos a preto (Figura 3.26C-D). Por histoquímica foi possível observar marcação intensa no adesivo secretado (Figura 3.26E), bem como no disco, mais precisamente na zona da epiderme adesiva e na cutícula (Figura 3.26F). No caule não se observou qualquer marcação.

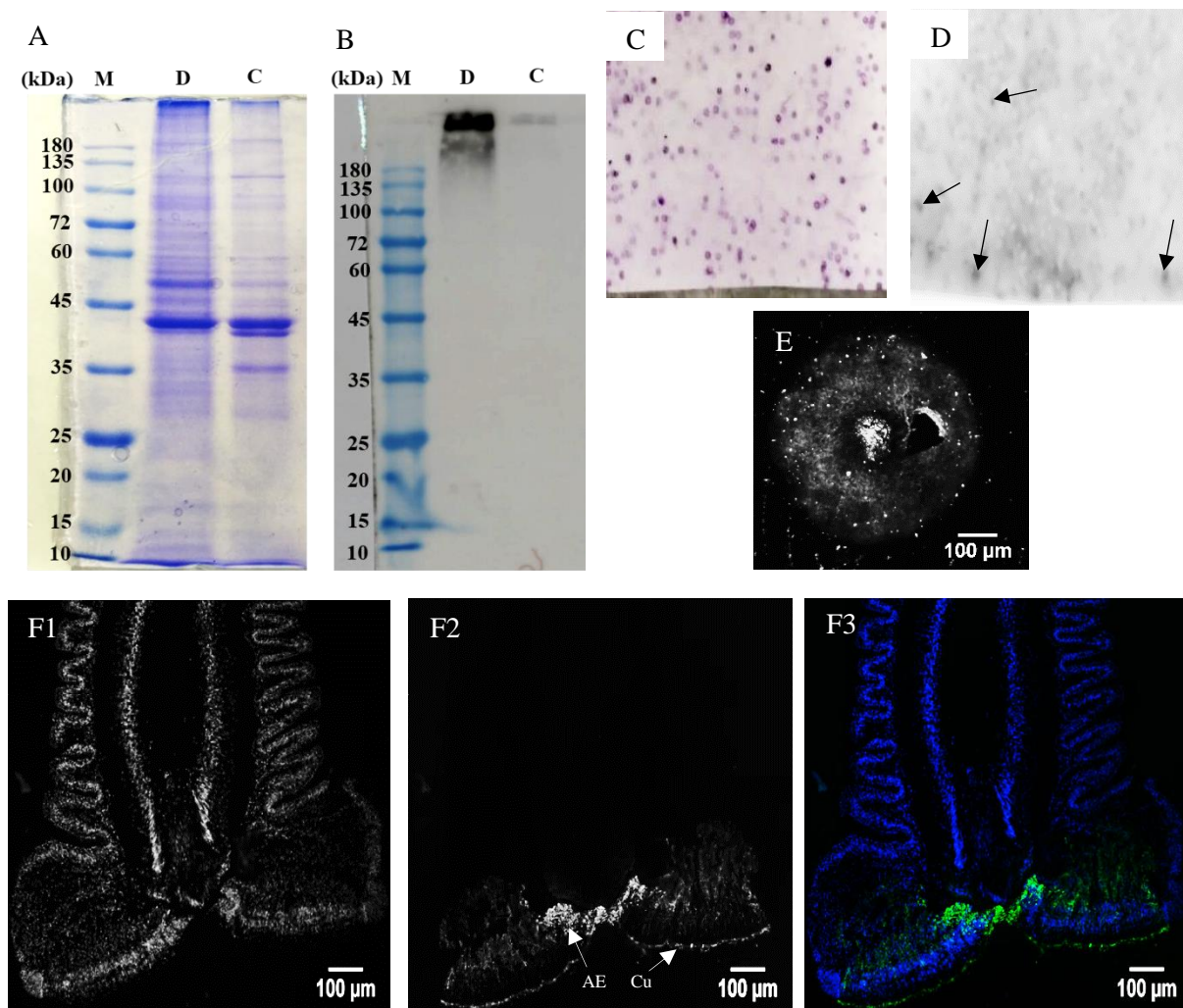


Figura 3.26 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina LEL (*Lycopersicon esculentum* lectin). **A**- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. **B** – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 1min). **C** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **D** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 1.5 seg). **E** - Adesivo marcado após incubação com a lectina. **F**– Histoquímica do pé ambulacrário. **F1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **F2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **F3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE – epiderme adesiva; C – Caule; Cu – cutícula; D – disco; M - Marcadores.

As lectinas **Jacalin**, **PNA**, **SBA**, **GSL I** e **RCA I** fazem parte do grupo de lectinas que deteta **Galactose** e **N-acetilgalactosamina**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância com estas 5 lectinas foi sempre superior nos extratos de discos do que nos extratos dos caules, sendo 1.3× com a Jacalin, 1.9× com a PNA, 2.1× com a SBA, 2.8× com a GSL I e 2.3× com a RCA I. A lectina PNA foi inibida com sucesso com 0.2 M de galactose, ao contrário da inibição da lectina Jacalin que não foi bem-sucedida com 0.4 M de galactose, assim como a inibição das lectinas SBA, GSL I e RCA I com 0.2 M de galactose (Figura 3.27) (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

Com a lectina **Jacalin**, não foi possível obter qualquer marcação nem no adesivo secretado, nem nos pés ambulacrários, com qualquer uma das técnicas (*lectin blotting* e histoquímica).

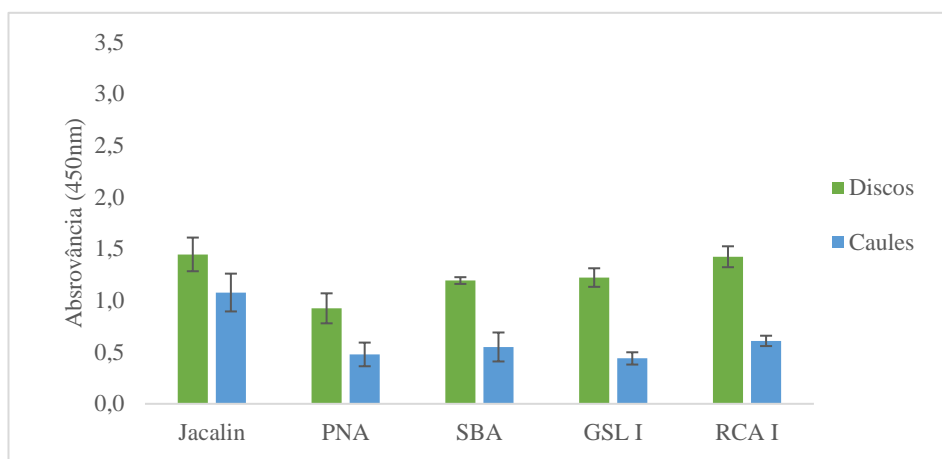


Figura 3.27 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas Jacalin, PNA (Peanut agglutinin), SBA (Soybean agglutinin), GSL I (*Griffonia simplicifolia* lectin I) e RCA I (*Ricinus communis* agglutinin I) que detetam Galactose e N-acetilgalactosamina. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

Com a lectina **PNA** não foi detetada qualquer glicoproteína no *lectin blotting* dos pés ambulacrários. Nem se obteve qualquer marcação no *lectin blotting* do adesivo secretado. Por histoquímica apenas se obteve marcação no pé ambulacrário, sendo ligeiramente mais intensa no disco do que no caule (Figura 3.28A).

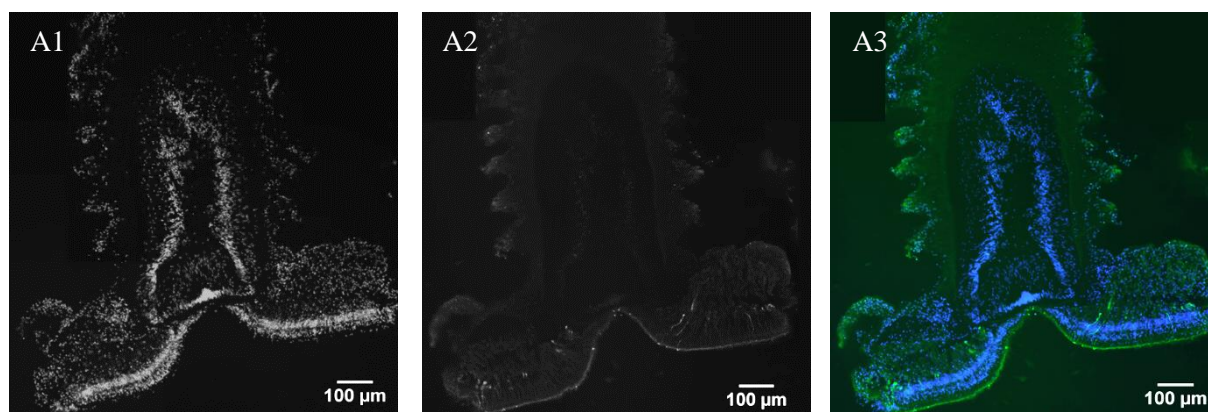


Figura 3.28 – Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina PNA (Peanut agglutinin). **A1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **A2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **A3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

A lectina **SBA** detetou no *lectin blotting* duas bandas muito intensas com massas moleculares de 72 e 135 kDa nos extratos dos discos, e apenas uma banda muito tênue nos extratos dos caules com 72 kDa (Figura 3.29A-B). No *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicando marcação positiva com esta lectina (Figura 3.29C-D). Em concordância, por histoquímica também foi possível observar uma marcação no adesivo secretado sob a forma de um pontilhado fino (Figura 3.29E), e também marcação intensa nos pés ambulacrários mas restrita à zona da epiderme adesiva (Figura 3.29F).

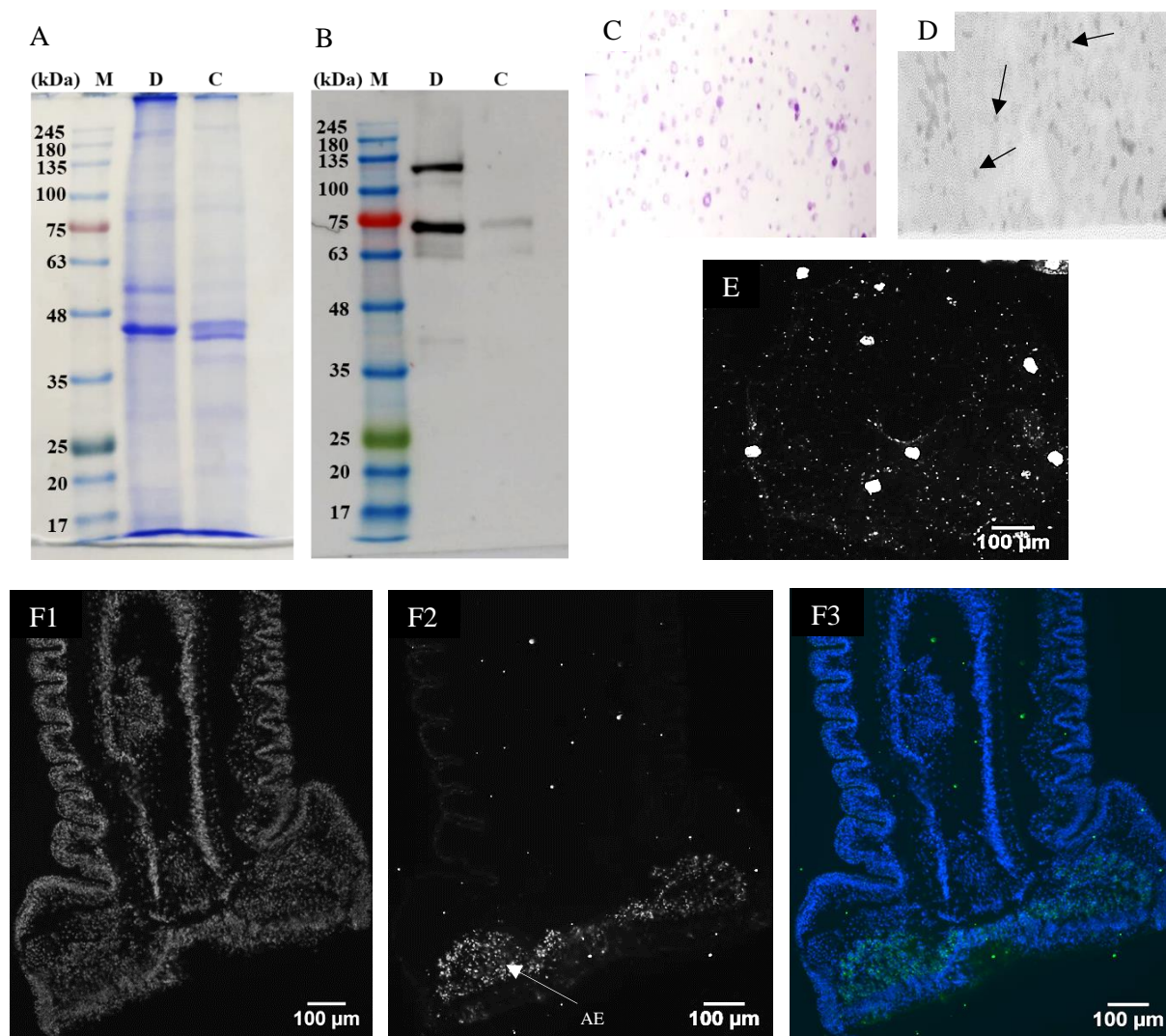


Figura 3.29 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-D) e histoquímica (E-F) usando a lectina SBA (*Soybean agglutinin*). A- SDS-PAGE em gel de 12.5% de acrilamida, corado com Azul de Coomassie Brilliant Blue. B – *Lectin-blotting* dos extratos dos pés ambulacrários (tempo de exposição de 40 seg). C – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). D – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 1 min). E - Adesivo marcado após incubação com a lectina. F– Histoquímica do pé ambulacrário. F1 - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). F2 – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). F3 – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: AE – epiderme adesiva; C – Caule; D – disco; M - Marcadores.

Com a lectina **GSL I**, não foi detetada qualquer glicoproteína nos pés ambulacrários por *lectin blotting*. Já no *lectin blotting* do adesivo foi possível visualizar pequenos círculos a preto indicativos de marcação positiva com esta lectina (Figura 3.30A-B). Por histoquímica obteve-se marcação intensa do adesivo secretado (Figura 3.30C), e também no disco do pé ambulacrário, mas restrita à cutícula (Figura 3.30D).

A lectina **RCA I** não detetou qualquer glicoproteína no *lectin blotting* dos extratos dos pés ambulacrários. Contudo no *lectin blotting* do adesivo foi possível obter marcação positiva com esta lectina (Figura 3.31A-B). Por histoquímica foi possível observar marcação no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.31D1-D3), assim como no adesivo secretado (Figura 3.31C).

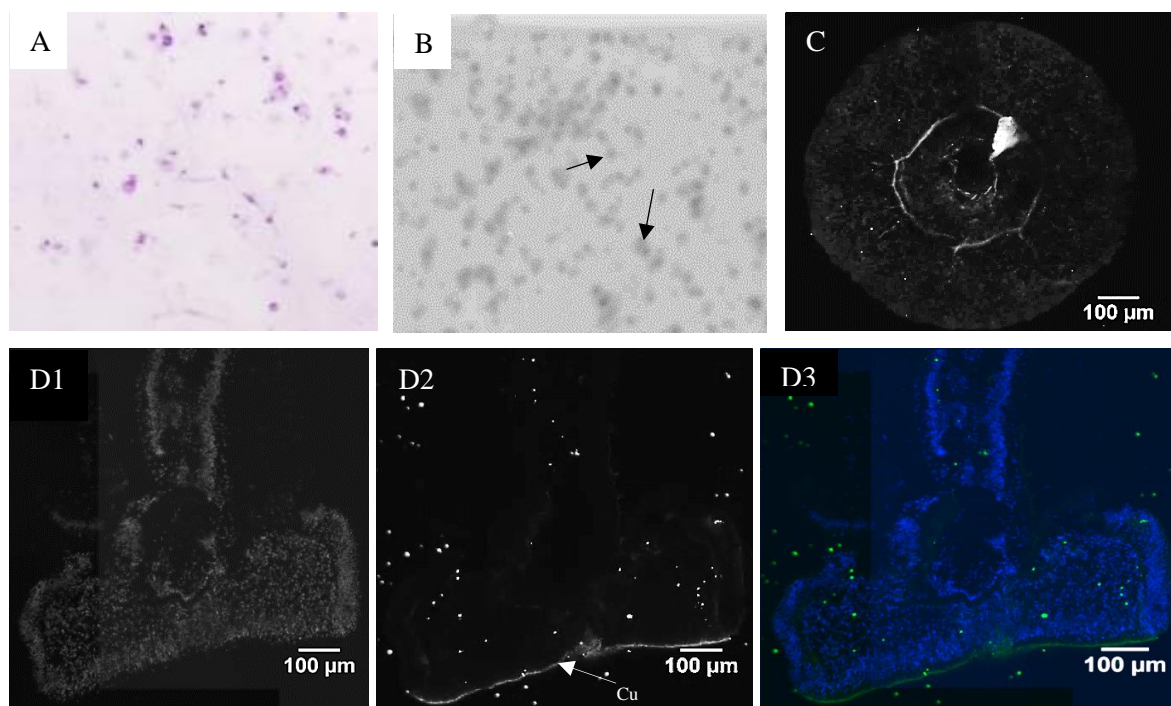


Figura 3.30 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C-D) usando a lectina GSL I (*Griffonia simplicifolia* lectin I). **A** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **B** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 2 min). **C** – Adesivo marcado após incubação com a lectina. **D** – Histoquímica do pé ambulacrário. **D1** – Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **D2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **D3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde). Legenda: C – Cutícula.

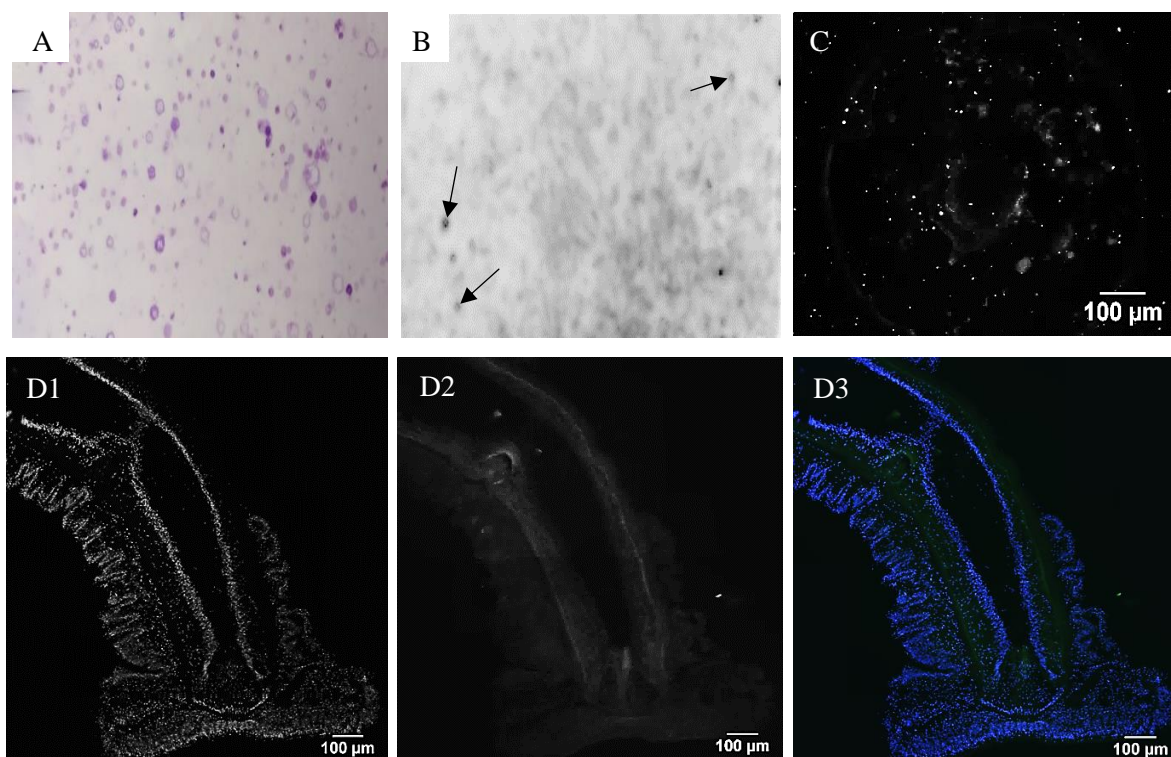


Figura 3.31 – Compilação dos resultados obtidos por *lectin blotting* (A-B) e histoquímica (C-D) usando a lectina RCA I (*Ricinus communis* agglutinin I). **A** – Membrana de PVDF corada com uma solução aquosa de 0.05% de violeta cristal que permite comprovar a presença de adesivo (setas indicam exemplos de deposição de adesivo). **B** – *Lectin-blotting* do adesivo (tempo de exposição de 2 min). **C** – Adesivo marcado após incubação com a lectina. **D** – Histoquímica do pé ambulacrário. **D1** – Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **D2** – Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **D3** – Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

A **Fucose** é apenas detetada pela lectina **UEA I**. No ensaio ELLA verificou-se que a absorvância dos extratos dos discos é apenas ligeiramente superior à absorvância dos extratos dos caules (Figura 3.32). Esta lectina foi inibida com sucesso com 0.4 M de fucose (Tabela Suplementar 7.1 e 7.2).

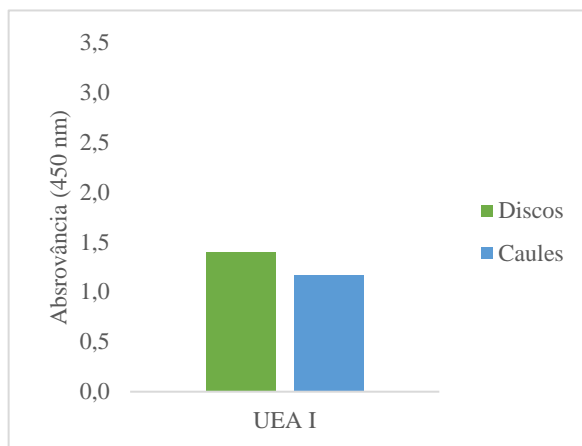


Figura 3.32 - Comparação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários ouriço do mar *P. lividus*, incubados com as lectinas UEA I (*Ulex europaeus* agglutinin I) que deteta Fucose. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

No *lectin blotting* dos extratos dos pés ambulacrários não foi identificada qualquer glicoproteína. No entanto por histoquímica foi possível observar uma marcação ligeira no disco e no caule do pé ambulacrário (Figura 3.33). Já para o adesivo secretado não se obteve qualquer resultado com ambas as técnicas.

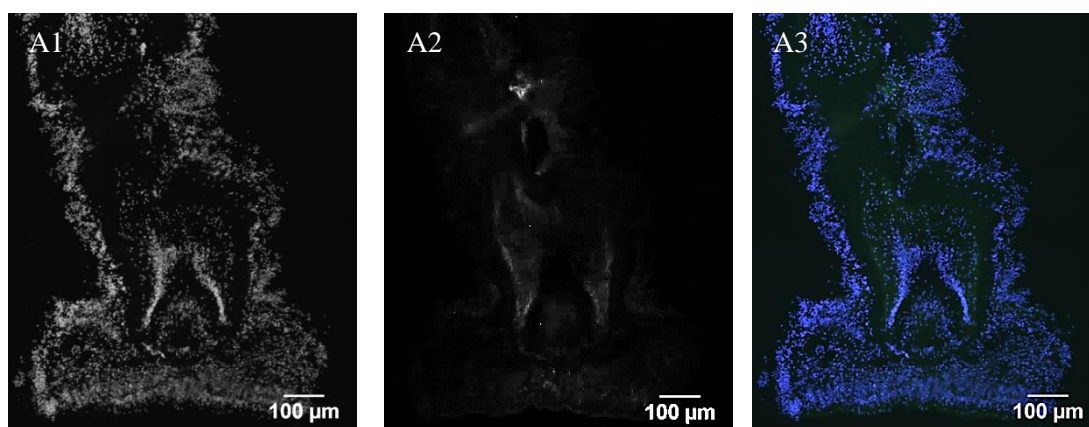


Figura 3.33 – Compilação dos resultados obtidos por histoquímica usando a lectina UEA I (*Ulex europaeus* agglutinin I). **A1** - Marcação dos núcleos celulares (DAPI). **A2** - Marcação após incubação com a lectina (Alexa Fluor 488). **A3** - Sobreposição da marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul) e marcação com a lectina (Alexa Fluor 488 – verde).

4. Discussão dos resultados

Ao longo deste projeto foram utilizadas três técnicas distintas que usam lectinas para detectar glícidos livres e conjugados nos pés ambulacrários e no adesivo secretado do ouriço do mar *Paracentrotus lividus*, com o objetivo de conhecer um pouco mais a composição deste adesivo reversível.

Dos resultados apresentados anteriormente, os mais relevantes para a compreensão da adesão dos ouriços do mar são aqueles em que obtivemos uma marcação claramente superior nos discos, em particular na zona da epiderme adesiva (onde se encontram os grânulos adesivos) e em simultâneo marcação intensa no adesivo, uma vez que demonstram que o glícido livre ou conjugado é produzido na zona adesiva do disco e é ativamente secretado para o adesivo.

Ao efetuar-se uma análise comparativa das 22 lectinas testadas utilizando a técnica ELLA (Tabela 4.1), verificou-se que as maiores diferenças em termos de absorvâncias dos extratos de discos e caules foram obtidas com as lectinas GSL II, VVA, SNA/EBL, WGA, SBA, GSL I e RCA I, visto que a absorvância dos extratos dos discos é duas ou mais superior à absorvância dos extratos dos caules. No entanto, a conjugação destes resultados com as outras técnicas, permitiu-nos aferir que algumas destas lectinas não são relevantes para o estudo da fração glicídica do adesivo.

Em relação aos resultados obtidos por histoquímica podemos agrupar as lectinas da seguinte forma (Tabela 4.1): **1)** marcação na zona da epiderme adesiva do disco e no adesivo secretado (GSL II, WGA, STL, LEL e SBA); **2)** marcação na cutícula do disco e no adesivo secretado (GSL I); **3)** marcação na zona da epiderme adesiva do disco (VVA); **4)** marcação em todo o pé ambulacrário e no adesivo secretado (ConA, LCA, PSA, PHA-E, PHA-L, ECL, DSL e RCA I); **5)** marcação só no pé ambulacrário (DBA, SNA/EBL, MAL II, sWGA, PNA, UEA I); **6)** sem qualquer marcação (Jacalin).

As lectinas do grupo 1 detetam N-acetilglucosamina (GSL II) e N-acetilglucosamina/N-acetilgalactosamina (WGA, STL, LEL e SBA) e parecem indicar glícidos que integram a composição da secreção adesiva provenientes das células adesivas ou de vestígios da cutícula que permanecem ligados ao adesivo após a “desadesão” do pé ambulacrário. Esta interpretação é corroborada pelo facto de a lectina do grupo 2 (GSL I) que deteta Galactose/N-acetilgalactosamina só marcar a cutícula e o adesivo secretado. Se conjugarmos estes resultados podemos concluir que provavelmente a cutícula é composta por N-acetilgalactosamina, enquanto que a secreção adesiva contém resíduos de N-acetilglucosamina e N-acetilgalactosamina. A lectina do grupo 3 (VVA) também deteta N-acetilgalactosamina mas numa posição terminal e só marcou a cutícula (corroborando a nossa hipótese) e a epiderme adesiva. O facto de as lectinas do grupo 4 (ConA, LCA, PSA, PHA-E, PHA-L, ECL, DSL e RCA I) também terem marcado o adesivo apesar de não serem seletivas para a epiderme adesiva, pode ser explicado pelo facto de estas lectinas marcarem também N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina, mas com outro tipo de arranjos ou ligadas a outros tipos de resíduos.

Os resultados obtidos por *lectin blotting* foram muito úteis para destrinçar os açúcares que são secretados livres daqueles que são secretados conjugados com proteínas. Através da marcação com GSL II, foi possível determinar que a epiderme adesiva do disco e o adesivo secretado contém N-acetilglucosamina (GlcNAc) na forma livre, uma vez que não se detetou qualquer glicoproteína com esta lectina (Tabela 4.1, Figura 4.1).

Tabela 4.1 – Compilação dos resultados obtidos para as 22 lectinas com as 3 técnicas usadas para detetar glícidos livres e conjugados nos pés ambulacrários e no adesivo secretado do ouriço do mar *P. lividus*. Abreviaturas: AE – Epiderme adesiva; Cu – Cutícula; HL – Histoquímica com lectinas; ELLA – *Enzyme Linked Lectin Assay*; LB – *lectin blotting*. Na coluna da Histoquímica estão assinalados os tecidos mais relevantes para a adesão. Na coluna ELLA estão assinaladas as razões entre as absorvâncias dos discos e dos caules. Na coluna do *lectin-blotting* estão assinalados as massas moleculares das glicoproteínas que foram detetadas. Em todas as colunas a intensidade da deteção das lectinas está representada por: - não houve marcação, + marcação ligeira, ++ marcação intensa, +++ marcação muito intensa.

Lectina	Discos			Caules			Adesivo	
	HL	ELLA	LB	HL	ELLA	LB	HL	LB
GSL II	+++ AE	++ 2.6x	-	-	+	-	+	+
Con A	++	+++	+	++	+++	+	+	+
LCA	++	+++ 1.5x	++ 72 e 135 kDa	++	+++	+	+	+
PSA	+	++ 1.5x	++ 72 e 135 kDa	+	++	+	+	+
PHA-E	+	++	-	+	++	-	+	+
PHA-L	++	++ 1.6x	++	++	++	+	+	+
DBA	+	+++ 1.3x	++ 72 e 135 kDa	+	++	+	-	-
VVA	++ AE, Cu	++ 2x	-	-	+	-	-	-
ECL	+	++ 1.6x	-	+	+	-	+	+
SNA/EBL	+	++ 2.2x	++ 72 e 135 kDa	+	+	-	-	-
MAL II	++	+++ 1.6x	-	++	++	-	-	-
WGA	+++ AE, Cu	++ 3x	++ 72 e 135 kDa	-	+	-	+	+
sWGA	+	+	+	+	+	-	-	-
STL	+++ AE, Cu	++	++ >180 kDa	+	++	+	+	+
DSL	+	++ 1.8x	++	+	++	++	+	+
LEL	+++ AE, Cu	+	++ >180 kDa	-	+	+	++	+
Jacalin	-	++ 1.3x	-	-	++	-	-	-
PNA	+	++ 1.9x	-	+	+	-	-	-
SBA	+++ AE	++ 2.1x	++ 72 e 135 kDa	+	+	+	+	+
GSL I	++ Cu	++ 2.8x	-	-	+	-	+	+
RCA I	+	++ 2.3x	-	+	+	-	+	+
UEA I	+	++	-	+	++	-	-	-

Das 22 lectinas, apenas 6 (LCA, PSA, DBA, SNA/EBL, WGA e SBA) detetaram duas glicoproteínas com massas moleculares de 72 e 135 kDa (Tabela 4.1). Estas lectinas têm em comum o facto de detetarem N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetilgalactosamina (GalNAc). No entanto, apenas 2 destas lectinas (WGA e SBA) detetaram também estes glícidos especificamente na epiderme adesiva do disco e no adesivo secretado (Figura 4.1), indicando que provavelmente estas duas glicoproteínas possuem resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc β (1,4)GlcNAc), ácido siálico (Neu5Ac) e/ou N-acetilgalactosamina (GalNAc).

As lectinas STL e LEL detetaram uma banda com massa molecular acima dos 180 kDa muito mais intensa nos discos do que nos caules (Tabela 4.1, Figura 4.1), o que indica que a glicoproteína detetada contém provavelmente várias unidades de N-acetilglucosamina sob a forma de GlcNac β (1,4)GlcNac. Esta glicoproteína muito provavelmente integra a composição do adesivo, uma vez que estas lectinas detetaram especificamente este glícido na epiderme adesiva do disco e no adesivo secretado.

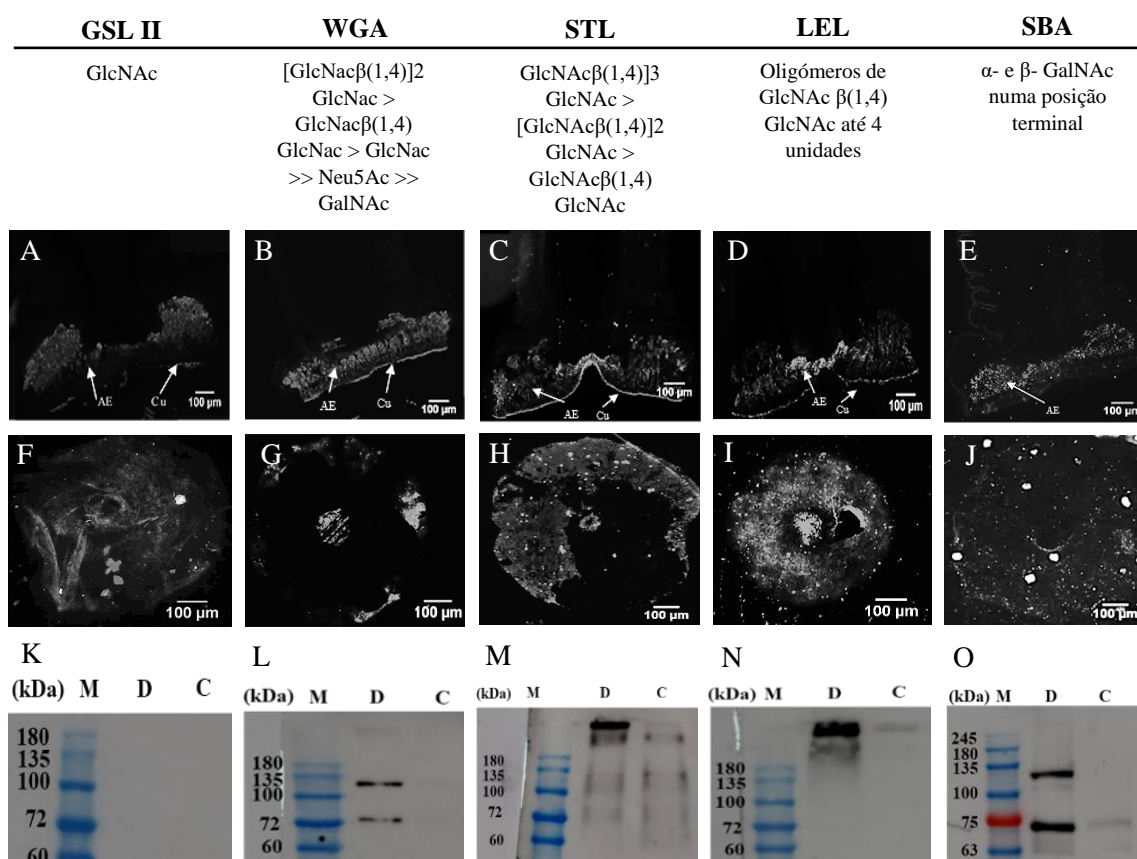


Figura 4.1 – Compilação dos resultados obtidos para a lectinas GSL II (A,F,K), WGA (B,G,L), STL (C,H,M), LEL (D,I,N) e SBA (E,J,O). A – E Histoquímica dos pés ambulacrários. F – J Histoquímica do adesivo secretado. K – O Lectin blotting dos pés ambulacrários. Legenda: AE – epiderme adesiva, C – caules, Cu – cutícula, D – discos, M – marcadores.

Em suma, o adesivo reversível do ouriço do mar *P. lividus* é composto por N-acetilglucosamina (GlcNac) na sua forma livre, e também por pelo menos 3 glicoproteínas com massas moleculares de 72, 135 e >180 kDa que possuem resíduos de N-acetilglucosamina sob a forma de GlcNac β (1,4)GlcNac, ácido siálico (NeuAc) e N-acetilgalactosamina (GalNac) (Figura 4.2).

Os resultados obtidos estão de acordo com os resultados já obtidos anteriormente através da análise do proteoma do adesivo e do proteoma diferencial do disco *versus* caule do ouriço do mar *P. lividus* (Lebesgue *et al.* 2016). Neste estudo foi possível identificar proteínas homologas a sialidasas sobre-expressas no disco, que se pensa serem constituintes da secreção “desadesiva” (Lebesgue *et al.* 2016). A detecção neste projeto de ácido siálico conjugado com glicoproteínas constituintes do adesivo é mais um argumento a favor desta hipótese. Outra possibilidade é que a marcação de glicoconjugados com alta massa molecular pela WGA corresponda a proteoglicanos sialilados, tal como foi reportado para o adesivo da estrela do mar *A. rubens* (Hennebert *et al.* 2011). A abordagem proteômica, detetou também outra proteína sobre-expressa no disco com homologia com asparaginases. Estas enzimas são responsáveis pela hidrolisação de resíduos de asparagina, que se sabe serem possíveis locais de glicosilação (Lebesgue *et al.* 2016). Pensa-se que esta enzima também integrará a composição da

secreção “desadesiva”, permitindo remover resíduos glicídicos das proteínas, interferindo assim com a sua função adesiva, promovendo a “desadesão” do pé ambulacrário. Sabe-se ainda que a única proteína adesiva identificada até à data no adesivo do ouriço *P. lividus*, a Nectina, possui várias isoformas glicosiladas (Santos *et al.* 2013) e contém seis domínios de ligação à galactose que podem ligar moléculas contendo resíduos de galactose e de N-acetilglucosamina (Costa *et al.* 2010). O massa molecular da Nectina é de 108 kDa, mas esta proteína forma dímeros (Costa *et al.* 2010), pelo que podemos especular que a glicoproteína com mais de 180 kDa que possui resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNac β (1,4)GlcNac) possa ser a Nectina e/ou que a Nectina possa estabelecer ligações com os resíduos de N-acetilglucosamina que também detetámos livre no adesivo do ouriço do mar. Por fim, a deteção da cutícula e do adesivo secretado com a mesma lectina (WGA, STL, LEL, GSL I) vai ao encontro da hipótese de “desadesão” por via enzimática, que propõe que parte da cutícula pode ficar incorporada no adesivo após a remoção do pé ambulacrário (Flammang 1996, Flammang *et al.* 1998).

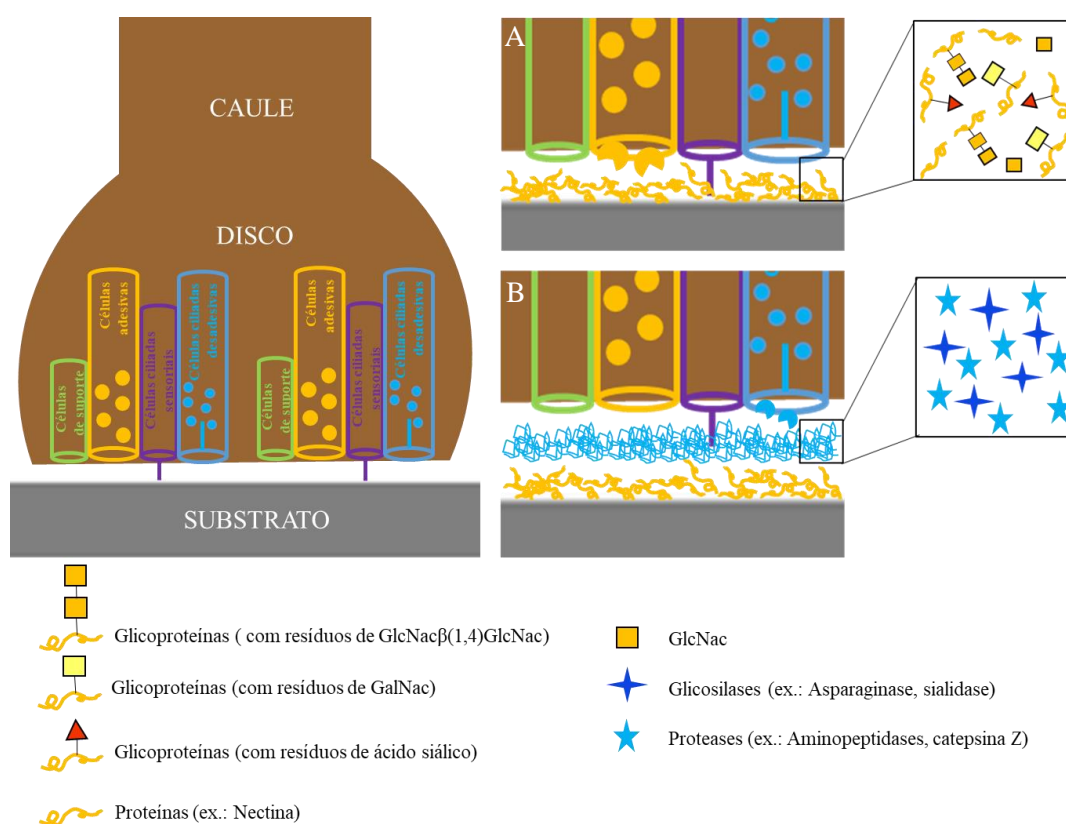


Figura 4.2 – Novo modelo molecular dos princípios intervenientes na adesão reversível do ouriço do mar *P. lividus* à luz dos resultados obtidos no presente projeto. **A** – adesão. **B** – “desadesão”. Legenda: GalNac – N-acetilgalactosamina, GlcNac – N-acetilglucosamina.

Sabe-se que as modificações pós-tradução de proteínas desempenham um papel importante nos mecanismos adesivos em vários organismos (Smith & Callow 2006). As primeiras evidências de glicosilação de proteínas adesivas surgiram em organismos marinhos com adesão permanente (O-glicosilação em mexilhões e N-glicosilação em cracas) (Rzepecki & Waite 1993, Kamino *et al.* 2012) e transitória (Smith *et al.* 1999). Mais recentemente demonstrou-se também o envolvimento de glicoproteínas em organismos com adesão temporária como a estrela do mar *A. rubens* (Hennebert *et al.* 2011) e nos platelmintes *M. lignano* (Wunderer *et al.* 2019) e *Minona ileanae* (Pjeta *et al.* 2019).

Na estrela do mar *A. rubens*, foram testadas 16 lectinas, das quais somente 2 marcaram o material extraído do adesivo (SJA e PNA), 4 (ConA, DBA, WGA e RCA) marcaram a zona da epiderme

adesiva, o adesivo secretado e as proteínas extraídas do adesivo, 3 (UEA I, MAL II e GSL I) marcaram a zona da epiderme adesiva e as proteínas extraídas do adesivo e por ultimo 4 (SNA, PHA-E, PHA-L e SBA) marcaram apenas a zona da epiderme adesiva (Hennebert *et al.* 2011). Nas proteínas extraídas do material adesivo foi possível detetar vários tipos de glícidos em duas proteínas tais como resíduos de manose (ConA), fucose α 1,2 ligada a resíduos de galactose (UEA I), ácido siálico α 1,3 ligado a N-acetilgalactosamina (MAL II), N-acetilgalactosamina e resíduos de galactose (RCA, GSL I, DBA e SJA) e ácido siálico (WGA) (Hennebert *et al.* 2011).

No platelminte *M. lignano* já foram identificadas duas proteínas nas células adesivas e no adesivo secretado (Mlig-ap1 e Mlig-ap2), sendo uma delas uma glicoproteína (Mlig-ap2) com resíduos de galactose β 1,3 ligado a N-acetilgalactosamina (PNA) (Wunderer *et al.* 2019). A secreção adesiva do platelminte, *M. ileanae*, também foi estudada por histoquímica com lectinas, resultando na deteção de resíduos de glucose (PSA), N-acetilglucosamina (GSL II), galactose e N-acetilgalactosamina (PHA-E, PHA-L, PNA, GSL I, ECL, VVA e DBA) (Pjeta *et al.* 2019).

A presença de glícidos na secreção adesiva de vários animais marinhos e terrestres, revela a importância destes para a sua adesão. Pensa-se que os glícidos conferem aos adesivos alta resistência e coesão adesiva (Hennebert *et al.* 2011), sendo particularmente importantes para os adesivos reversíveis uma vez que são maioritariamente compostos por glícidos e proteínas (Flammang 1996).

5. Conclusão e perspectivas futuras

Neste projeto foram utilizadas três técnicas que permitiram caracterizar a fração glicídica do adesivo produzido pelo ouriço do mar *P. lividus*.

A técnica ELLA permitiu quantificar os glícidos de forma rápida, no entanto apresentou algumas limitações, como a inibição das lectinas. Esta por vezes não foi total, uma vez que os glícidos detetados pelas lectinas são mais complexos que os glícidos recomendados pelo fabricante utilizados na inibição. Os resultados obtidos com a técnica ELLA não foram os melhores uma vez que não foram corroborados com as outras duas técnicas mais fiáveis.

Com o *lectin blotting* e com a histoquímica de lectinas foi possível aferir que glícidos estão na composição do adesivo secretado. Os resultados obtidos nestas duas técnicas foram conclusivos e fiáveis, visto que ambas as técnicas estiveram em concordância.

Através destas metodologias baseadas em lectinas foi possível estender o nosso conhecimento sobre a composição da secreção adesiva, revelando que a componente glicídica engloba N-acetilglucosamina livre (GlcNac), e pelo menos três glicoproteínas com uma massa molecular de 72, 135 e > 180 kDa com resíduos de N-acetilglucosamina, ácido siálico e N-acetilgalactosamina.

Estes resultados levantam novas questões que poderão ser aprofundadas no futuro tais como a identificação destas glicoproteínas e dos seus locais de glicosilação. Para tal, as lectinas que detetam os glícidos relevantes para a adesão reversível do ouriço do mar *P. lividus*, podem ser usadas para purificar as glicoproteínas (“*pull-down*”), seguido da sua identificação por espectrometria de massa. A recente análise do transcriptoma dos pés ambulacrários de *P. lividus* oferece uma oportunidade sem precedentes para caracterizar ainda mais as proteínas envolvidas na adesão, polimerização do adesivo e “desadesão”, produzindo assim informação essencial para o futuro desenvolvimento de adesivos biomiméticos inspirados em ouriços do mar.

6. Referências

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science. 4 (2002).
- Andrews D. SDS-PAGE. Andrews Lab. Disponível em: andrewslab.ca. (Acedido: 27 agosto 2019)
- Ameye, L., Hermann, R., Dubois, P., & Flammang, P. Ultrastructure of the echinoderm cuticle after fast freezing / freeze substitution and conventional chemical fixations. *Microscopy Research and Technique*. 48(6), 385–393 (2000).
- Brennan, M. Fibrin glue. *Blood Reviews*. 5, 240–244 (1991).
- Brooker, R., Widmaier, E., Graham, L., & Stiling, P. *Biology*, 4th. Mc Graw Hill Education. 4, 694–699 (2017)
- Cao, J., Guo, S., Arai, K., Lo, E. H., & Ning, M. M. Studying extracellular signalling utilizing a glycoproteomic approach: Lectin blot surveys, a first and important step. *Methods in Molecular Biology*. 1013, 227–233 (2013).
- Chial, H.J., Thompson, H.B., and Splittgerber, A.G. A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. *Anal. Biochem*. 209, 258–266 (1993).
- Chivers, R. A., & Wolowacz, R. G. The strength of adhesive-bonded tissue joints. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 17(2), 127–132 (1997).
- Costa, C., Cavalcante, C., Zito, F., Yokota, Y., & Matranga, V. Phylogenetic analysis and homology modelling of *Paracentrotus lividus* nectin. *Molecular Diversity*. 14(4), 653–665 (2010).
- Danguy, A., Kiss, R., & Pasteels, J. L. Lectins in histochemistry. A survey. *Biological Structures and Morphogenesis* (1988).
- Debray, H., Montreuil, J., Lis, H., & Sharon, N. Affinity of four immobilized Erythrina lectins toward various n-linked glycopeptides and related oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 151(C), 359–370 (1986).
- Ebnesajjad, S., & Landrock, A. H. Adhesive Applications and Bonding Processes. In *Adhesives Technology Handbook*. Elsevier. 206–234 (2015).
- Ferreira, P., Gil, M. H., & Alves, P. An overview in surgical adhesives. In *Recent Advances in Adhesions Research*. Nova Science Publishers. 59–85 (2013).
- Flammang, P. In *Echinoderm studies* 5. 1–60 (1996).
- Flammang, P. Adhesive Secretions in Echinoderms: An Overview. In *Biological Adhesives*. Springer Berlin Heidelberg. 183–206 (2006).
- Flammang, P., Demeuldre, M., Hennebert, E., & Santos, R. Adhesive secretions in echinoderms: A review. In *Biological Adhesives, Second Edition*. Springer International Publishing. 193–222 (2016).
- Flammang, P., Gosselin, P., & Jangoux, M. The Podia, organs of adhesion and sensory perception in larvae and post-metamorphic stages of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Biofouling*. 12(1–3), 161–171 (1998a).
- Flammang, P., & Jangoux, M. Functional morphology of coronal and peristomeal podia in *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*. 113(1), 47–60 (1993).

- Flammang, P., Ribesse, J., A. M. J. Biomechanics of Adhesion in Sea Cucumber Cuvierian Tubules. *INTEGR.COMP.BIOL.* 42, 1107–1115 (2002).
- Flammang, P., Santos, R., & Haesaerts, D. Echinoderm adhesive secretions: from experimental characterization to biotechnological applications. *Progress in Molecular and Subcellular Biology.* 39, 201–220 (2005).
- Flammang, P., & Walker, G. Measurement of the Adhesion of the Podia in the *Asteroid Asterias Rubens* (Echinodermata). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 77(4), 1251–1254 (1997).
- Gago, J., Range, P., & Luis, O. Growth. Reproductive biology and habitat selection of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the coastal waters of Cascais, Portugal. In *Echinoderm Research 2001* (2003).
- Gohad, N. V., Aldred, N., Hartshorn, C. M., Lee, Y. J., Cicerone, M. T., Orihuela, B., ... Mount, A. S. Synergistic roles for lipids and proteins in the permanent adhesive of barnacle larvae. *Nature Communications.* 5 (2014).
- Gomori. A rapid one-step trichrome stain. *American Journal of Clinical Pathology.* 20(7), 661–664 (1950).
- Grenon, J. F., & Walker, G. The tenacity of the limpet, *Patella vulgata* L.: An experimental approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 54(3), 277–308 (1981).
- Hames, B., and Rickwood, D. Gel electrophoresis: a practical approach. *Vasa.* 376 (1998).
- Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., & Lee, C. S. Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ.* 9 (2017).
- Hennebert, E., Gregorowicz, E., & Flammang, P. Involvement of sulfated biopolymers in adhesive secretions produced by marine invertebrates. *Biology Open.* 7(11) (2018).
- Hennebert, E., Haesaerts, D., Dubois, P., & Flammang, P. Evaluation of the different forces brought into play during tube foot activities in sea stars. *Journal of Experimental Biology.* 213(7), 1162–1174 (2010).
- Hennebert, E., Maldonado, B., Ladurner, P., Flammang, P., & Santos, R. Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: A review. *Interface Focus.* 5(1), 1–19 (2015).
- Hennebert, E., Wattiez, R., & Flammang, P. Characterisation of the Carbohydrate Fraction of the Temporary Adhesive Secreted by the Tube Feet of the Sea Star *Asterias rubens*. *Marine Biotechnology.* 13(3), 484–495 (2011).
- Hennebert, E., Wattiez, R., Waite, J. H., & Flammang, P. Characterization of the protein fraction of the temporary adhesive secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *Biofouling.* 28(3), 289–303 (2012).
- Hickman, C., Roberts, L., & Larson, A. *Animal Diversity.* McGraw Hill Science. 3 (2003).
- Kamino K, Nakano M, Kanai S. Significance of the conformation of building blocks in curing of barnacle underwater adhesive. *FEBS J.* 279, 1750 – 1760 (2012).
- Kruger N.J. The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker J.M. *The Protein Protocols Handbook.* Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ (2009).

- Lebesgue, N., da Costa, G., Ribeiro, R. M., Ribeiro-Silva, C., Martins, G. G., Matranga, V., ... Santos, R. Deciphering the molecular mechanisms underlying sea urchin reversible adhesion: A quantitative proteomics approach. *Journal of Proteomics*. 138, 61–71 (2016).
- Lengerer, B., Hennebert, E., Flammang, P., Salvenmoser, W., & Ladurner, P. Adhesive organ regeneration in *Macrostomum lignano*. *BMC Developmental Biology*. 16(1) (2016).
- Lengerer, B., & Ladurner, P. Properties of temporary adhesion systems of marine and freshwater organisms. *Journal of Experimental Biology*. Company of Biologists Ltd (2018).
- Matranga, V., Di Ferrol, D., Zito, F., Cervello, M., & Nakano, E. A new extracellular matrix protein of the sea urchin embryo with properties of a substrate adhesion molecule. *Roux's Archives of Developmental Biology*. 201(3), 173–178 (1992).
- Mistry, N., Harrington, W., Lasda, E., Wagner, E. J., & Garcia-Blanco, M. A. Of urchins and men: Evolution of an alternative splicing unit in fibroblast growth factor receptor genes. *RNA*. 9(2), 209–217 (2003).
- Ohkawa, K., Nishida, A., Yamamoto, H., & Waite, J. H. A glycosylated byssal precursor protein from the green mussel *Perna viridis* with modified dopa side chains. *Biofouling*. 20(2), 101–115 (2004).
- Pagett, H. E., Abrahams, J. L., Bones, J., O'Donoghue, N., Marles-Wright, J., Lewis, R. J., ... Clare, A. S. Structural characterisation of the N-glycan moiety of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC). *Journal of Experimental Biology*. 215(7), 1192–1198 (2012).
- Paine, V. L. Adhesion of the tube feet in starfishes. *Journal of Experimental Zoology*. 45(1), 361–366 (1926).
- Pjeta, R., Wunderer, J., Bertemes, P., Hofer, T., Salvenmoser, W., Lengerer, B., ... Ladurner, P. Temporary adhesion of the proseriate flatworm *Minona ileanae*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 374(1784), 20190194 (2019).
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., & Lunardi, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. In *Electrophoresis*. 18, 307–316 (1997).
- Roth, Z., Yehezkel, G., & Khalaila, I. Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 1–10 (2012).
- Rzepecki LM, Waite JH. The byssus of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. II. Structure and polymorphism of byssal polyphenolic protein families. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2, 267 – 279 (1993).
- Santos, R., Barreto, Â., Franco, C., & Coelho, A. V. Mapping sea urchins tube feet proteome - A unique hydraulic mechano-sensory adhesive organ. *Journal of Proteomics*. 79, 100–113 (2013).
- Santos, R., da Costa, G., Franco, C., Gomes-Alves, P., Flammang, P., & Coelho, A. V. First insights into the biochemistry of tube foot adhesive from the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinoidea, Echinodermata). *Marine Biotechnology*. 11(6), 686–698 (2009b).
- Santos, R., & Flammang, P. Morphometry and mechanical design of tube foot stems in sea urchins: A comparative study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 315(2), 211–223 (2005).
- Santos, R., & Flammang, P. Morphology and tenacity of the tube foot disc of three common European sea urchin species: A comparative study. *Biofouling*. 22(3), 187–200 (2006).

- Santos, R., & Flammang, P. Estimation of the attachment strength of the shingle sea urchin, *Colobocentrotus atratus*, and comparison with three sympatric echinoids. *Marine Biology*. 154(1), 37–49 (2008).
- Santos, R., Gorb, S., Jamar, V., & Flammang, P. Adhesion of echinoderm tube feet to rough surfaces. *Journal of Experimental Biology*. 208(13), 2555–2567 (2005).
- Santos, R., Hennebert, E., Coelho, A. V., & Flammang, P. The echinoderm tube foot and its role in temporary underwater adhesion. In *Functional Surfaces in Biology*. Springer Netherlands. 2, 9–41 (2009a).
- Sato T. Lectin-Probed Western Blot Analysis. In: Hirabayashi J. *Lectins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, New York. 1200 (2014).
- Sharon, N., & Lis, H. How proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 6586–6591 (2002).
- Smith AM, Callow JA. *Biological adhesives*. Springer, Berlin (2006).
- Smith, A. M., T. J. Quick, and R. L. St. Peter. Differences in the composition of adhesive and non-adhesive mucus from the limpet *Lottia limatula*. *Biol. Bull.* 196, 34–44 (1999).
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R. Elastomeric proteins: Biological roles, structures and mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences* (2000).
- Thomas, L. A., & Hermans, C. O. Adhesive interactions between the tube feet of a starfish, *Leptasterias hexactis*, and substrata. *The Biological Bulletin*. 169(3), 675–688 (1985).
- Thompson, R., Creavin, A., O’Connell, M., O’Connor, B., & Clarke, P. Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Analytical Biochemistry*. 413(2), 114–122 (2011).
- Tyler S. The role of function in determination of homology and convergence—examples from invertebrates adhesive organs. *Fortsch Zool.* 36, 331–347 (1988).
- Viana, A. S., & Santos, R. Nanoscale characterization of the temporary adhesive of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 9(1), 2277–2286 (2018).
- Waite, J. H. Adhesion a la Moule. *Integrative and Comparative Biology*. 42(6), 1172–1180 (2002).
- Whittington ID, Cribb BW. Adhesive secretions in the Platyhelminthes. *Adv Parasitol.* 48, 101–224 (2001).
- Wi, G. R., Moon, B. I., Kim, H. J., Lim, W., Lee, A., Lee, J. W., & Kim, H. J. A lectin-based approach to detecting carcinogenesis in breast tissue. *Oncology Letters*. 11(6), 3889–3895 (2016).
- Williams & Wilkins. *HJ Conn’s Biological Stains*. Baltimore (MD). 9 (1977).
- Wunderer, J., Lengerer, B., Pjeta, R., Bertemes, P., Kremser, L., Lindner, H., ... Ladurner, P. A mechanism for temporary bioadhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116(10), 4297–4306 (2019).
- Yule & Walker. Adhesion in barnacles. In: Southward AJ (ed) *Crustacean issues, Biology of Barnacles*. Balkema, Rotterdam. 5, 6586–6591 (1987).

7. Anexos

Tabela Suplementar 7.1 – Compilação das concentrações de lectinas biotiniladas e diluições de Alexa 488 conjugado com streptavidina, utilizadas no *lectin blotting* (LB) e na histoquímica de lectinas (HL), e concentrações dos glícidos inibitórios utilizados no ELLA.

Lectina	Pés				Adesivo				Inibição	
	HL		LB		HL		LB		ELLA	
	Lectina (µg/ml)	Alexa 488 strep.	Lectina (µg/ml)	HRP strep.	Lectina (µg/ml)	Alexa 488 strep.	Lectina (µg/ml)	HRP strep.	Glícido	Sucesso
GSL II	3.5	1:200	1	1:5000	35	1:200	0.25	1:5000	Quitina hidrolisada 1:4	Não
Con A	2.5	1:200	1	1:5000	3.5	1:200	0.5	1:5000	α-Methylmannoside 0.4 M	Sim
LCA	2	1:200	1	1:5000	5	1:200	0.25	1:5000	α-Methylglucoside 0.2 M	Não
PSA	1.5	1:200	1	1:5000	5	1:200	0.5	1:5000	α-Methylglucoside 0.2 M	Não
PHA-E	2	1:800	1	1:5000	25	1:200	1	1:5000	Acido acético 100 mM	Parcial
PHA-L	35	1:200	1	1:5000	40	1:200	0.5	1:5000	Acido acético 100 mM	Parcial
DBA	1	1:200	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	N-Acetilgalactosamina 0.4 M	Parcial
VVA	2	1:200	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Não foi testada	
ECL	2	1:800	1	1:5000	3.5	1:200	0.5	1:5000	Lactose 0.4 M	Não
SNA/EBL	2	1:800	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Acido siálico 0.4 M	Sim
MAL II	3.5	1:200	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Acido siálico 0.4 M	Sim
WGA	20	1:100	1	1:5000	20	1:100	0.5	1:5000	N-Acetilglucosamina 0.2 M	Sim
sWGA	3	1:800	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Quitina Hidrolisada 1:4	Não

STL	3.5	1:200	1	1:5000	3.5	1:200	0.5	1:5000	Quitina Hidrolisada 1:4	Parcial
DSL	1	1:100	1	1:5000	10	1:800	1	1:5000	Quitina Hidrolisada 1:15	Não
LEL	3.5	1:100	1	1:5000	3.5	1:100	1	1:5000	Quitina Hidrolisada 1:4	Parcial
Jacalin	3.5	1:200	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Galactose 0.4 M	Não
PNA	3,5	1:200	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Galactose 0.2 M	Sim
SBA	35	1:200	1	1:5000	30	1:200	1	1:5000	Galactose 0.2 M	Não
GSL I	3.5	1:200	1	1:5000	3.5	1:200	1	1:5000	Galactose 0.2 M	Não
RCA I/RCA₁₂₀	3	1:800	1	1:5000	15	1:200	1	1:5000	Galactose 0.2 M	Não
UEA I	3.5	1:800	1	1:5000	-	-	0.5	1:5000	Fucose 0.4 M	Sim

Tabela Suplementar 7.2 – Compilação das absorvâncias obtidas através da técnica ELLA para os extratos de discos e caules dos pés ambulacrários, e para as amostras sem proteína. Valores médios e desvios padrão obtidos com 8 replicados.

Lectina	Absorvância da amostra de lectina				Absorvância da amostra de lectina inibida				Absorvância da amostra sem proteína			
	Média		Desvio Padrão		Média		Desvio Padrão		Média		Desvio Padrão	
	Discos	Caules	Discos	Caules	Discos	Caules	Discos	Caules	Discos	Caules	Discos	Caules
GSL II	1.463	0.559	0.108	0.041	1.197	0.497	0.052	0.078	0.114	0.111	0.012	0.009
Con A	2.992	2.975	0.019	0.058	0.316	0.294	0.115	0.054	0.366	0.219	0.101	0.058
LCA	2.814	1.829	0.261	0.213	2.077	1.327	0.221	0.156	0.152	0.151	0.022	0.022
PSA	1.253	0.851	0.170	0.237	1.516	0.554	0.309	0.352	0.101	0.100	0.004	0.003
PHA-E	1.281	1.223	0.114	-0.053	0.808	0.536	0.033	-0.067	0.099	0.191	0.004	0.195
PHA-L	1.801	1.136	0.156	0.203	0.533	0.276	0.104	0.034	0.195	0.144	0.054	0.023
DBA	2.217	1.631	0.103	0.243	0.523	0.440	0.140	0.191	0.177	0.133	0.053	0.020
VVA	1.729	0.835	0.201	0.060	NT	NT	NT	NT	0.760	0.711	0.023	0.049
ECL	1.336	0.816	-0.004	0.059	1.067	0.701	0.123	0.098	1.320	1.122	0.067	0.046
SNA	1.195	0.534	0.064	0.135	0.068	0.032	0.006	0.004	0.098	0.105	0.004	0.005
MAL II	2.119	1.273	0.124	0.047	-0.013	-0.030	-0.086	-0.014	0.177	0.159	0.110	0.030
WGA	1.766	0.519	0.251	0.177	-0.012	-0.011	0.008	-0.009	0.179	0.140	0.023	0.019
sWGA	0.555	0.511	0.231	0.097	0.483	0.350	0.191	0.231	0.121	0.142	0.015	0.026
STL	1.021	0.969	0.128	0.179	0.358	0.266	0.079	0.081	0.231	0.214	0.085	0.091
DSL	2.142	1.199	0.102	0.131	1.708	1.096	0.051	0.076	0.857	0.688	0.101	0.018
LEL	0.772	0.713	-0.034	0.016	0.600	0.331	0.073	0.019	0.223	0.222	0.135	0.141
Jacalin	1.446	1.077	0.163	0.183	1.769	0.825	0.161	0.347	1.229	1.077	0.054	0.051
PNA	0.924	0.478	0.145	0.115	0.113	0.085	0.013	0.012	0.147	0.124	0.009	0.012
SBA	1.193	0.550	0.033	0.140	1.437	1.884	0.019	0.181	0.129	0.118	0.040	0.011
GSL I	1.222	0.440	0.090	0.059	1.159	0.318	0.031	0.084	0.107	0.110	0.008	0.009
RCA I	1.423	0.609	0.101	0.050	1.171	0.549	0.080	0.043	0.106	0.107	0.003	0.008
UEA I	1.397	1.167	0.080	0.113	0.444	0.193	0.176	0.090	0.191	0.185	0.051	0.038
GSL II	1.463	0.559	0.108	0.041	1.197	0.497	0.052	0.078	0.114	0.111	0.012	0.009

NT – Não testada